

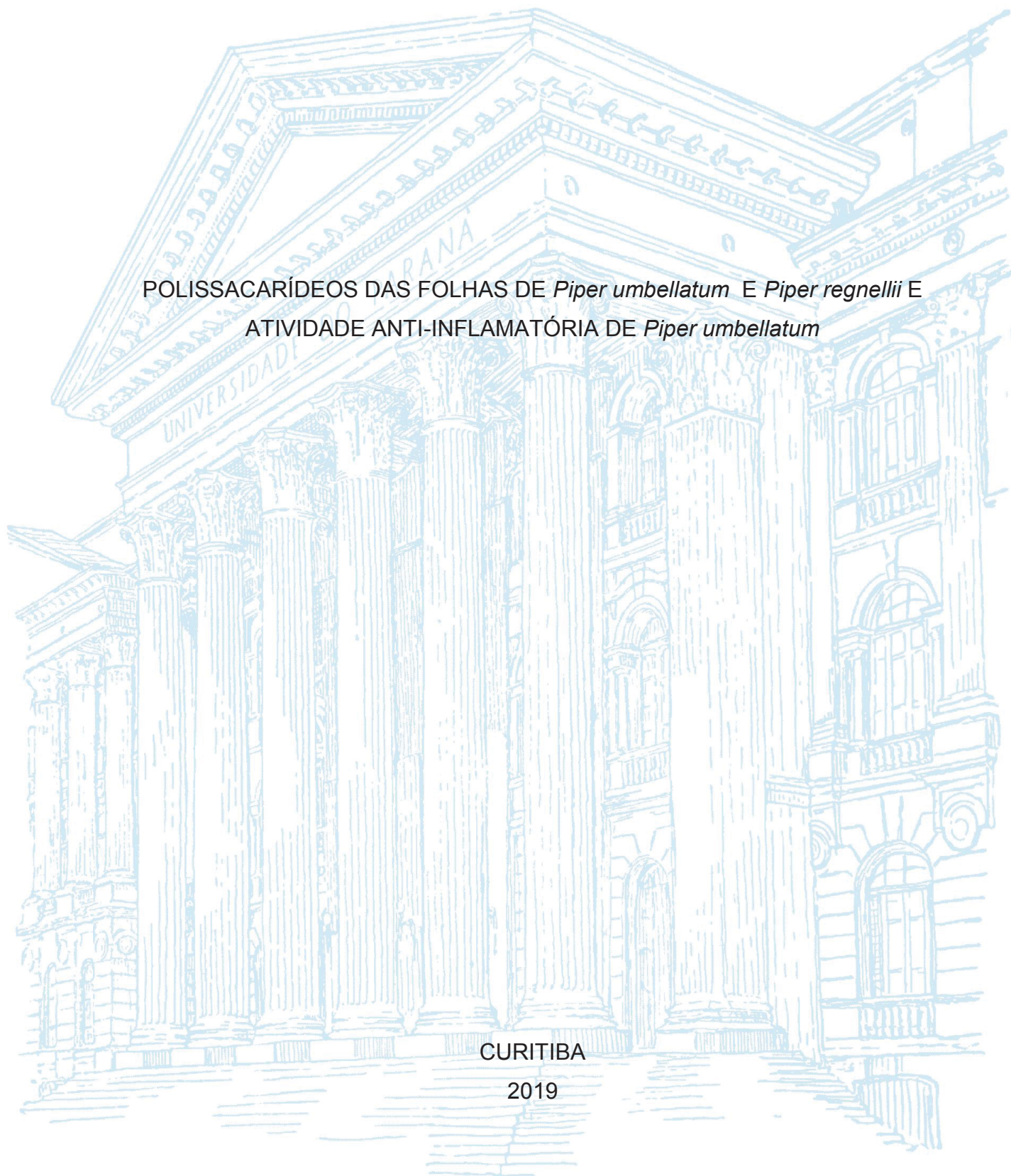
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

GIULIANA COZZELLA CAMPO GRANDE

POLISSACARÍDEOS DAS FOLHAS DE *Piper umbellatum* E *Piper regnellii* E
ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DE *Piper umbellatum*

CURITIBA

2019



GIULIANA COZZELLA CAMPO GRANDE

POLISSACARÍDEOS DAS FOLHAS DE *Piper umbellatum* E *Piper regnellii* E
ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DE *Piper umbellatum*

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (Bioquímica), Programa de Pós-Graduação em Ciências (Bioquímica), Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Thales Ricardo Cipriani

Co-orientadora: Dr. Daniele Maria Ferreira

CURITIBA

2019

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.
Biblioteca de Ciências Biológicas.
(Carla Fabiane Rasmussen – CRB/9-940).

Grande, Giuliana Cozzella Campo.

Polissacarídeos das folhas de *Piper umbellatum* e *Piper regnellii* e
atividade anti-inflamatória de *Piper umbellatum*. / Giuliana Cozzella Campo
Grande. – Curitiba, 2019.

86 p. : il. ; 30cm.

Orientador: Thales Ricardo Cipriani.

Coorientadora: Daniele Maria Ferreira.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de
Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências – Bioquímica.

1. Polissacarídeos. 2. Anti-inflamatórios. I. Título. II. Cipriani, Thales
Ricardo. III. Ferreira, Daniele Maria. IV. Universidade Federal do Paraná.
Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências –
Bioquímica.

CDD (20. ed.) 547.782



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIAS
(BIOQUÍMICA) - 40001016303P2

TERMO DE APROVAÇÃO

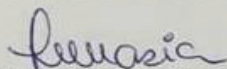
Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS (BIOQUÍMICA) da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **GIULIANA COZZELLA CAMPO GRANDE** intitulada: **Polissacarídeos das folhas de *Piper umbellatum* e *Piper regnellii* e atividade anti-inflamatória de *Piper umbellatum***, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua aprovação no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 20 de Março de 2019.

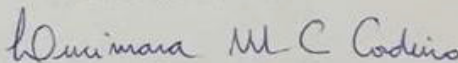

THALES RICARDO CIPRIANI

Presidente da Banca Examinadora (UFPR)



MARIA FERNANDA DE PAULA WERNER

Avaliador Externo (UFPR)



LUCIMARA MACH CORTES CORDEIRO

Avaliador Interno (UFPR)

Dedico este trabalho à minha mãe, Andréa: exemplo de força, minha melhor amiga e
inspiração.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, queria agradecer a todos os envolvidos no desenvolvimento deste trabalho, seja de forma ativa ou não. Muitas pessoas fizeram deste um caminho melhor e mais fácil a ser traçado e me permitiram não só desenvolver o lado intelectual e acadêmico como também o pessoal, e por isso, sou extremamente grata.

Gostaria de agradecer à minha família por todo o apoio e incentivo. Destaque à minha mãe/pai, Andréa, que é a pessoa mais guerreira que já conheci. Se algum dia eu chegar a ser metade do que ela é, dou-me por satisfeita. Ao meu avô, José Gianni, a pessoa mais generosa do mundo e que me incentiva a fazer tudo que posso para poder crescer e sempre me deseja o melhor; e à minha amada avó (*in memoriam*), Dona Cida, que foi a pessoa mais doce e gentil que já conheci em toda minha vida. A saudade de você não cabe em mim. Espero poder te orgulhar de alguma forma onde quer que você esteja.

Ao meu melhor amigo e amor, João Paulo, que sempre constrói os degraus para me ver subir. Obrigada pelo incentivo, apoio e amor, e por sempre me fazer acreditar em mim mesma, até mesmo quando eu tenho dúvidas.

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Thales Ricardo Cipriani, por todo o admirável e inspirador conhecimento, ajuda e acessibilidade e pela oportunidade de ter aceitado me orientar; à minha co-orientadora, Dr. Daniele Maria Ferreira, por me ajudar com todos os experimentos biológicos.

À banca: Prof. Dr. Lucimara Mach Cortês Cordeiro, pela correção do projeto e relatório, e por sanar diversas dúvidas que tive ao longo do projeto; à Prof. Dr. Maria Fernanda de Paula Werner, por nunca ter medido esforços para me ajudar e por me ensinar o real significado de colaboração científica.

Gostaria de agradecer aos meus colegas de laboratório da 250, 252, 247 e E1: Pedro, Helyn, Yony, Ana Flávia, Franciê, Dani, Philippe, Helen, Shay, Vanessa, Adri e Iglesias. É inexplicável como me fizeram bem e como me ajudaram nos últimos dois anos. O que aprendi com vocês não está escrito nos livros. Obrigada

também pela cooperação, assistência na bancada e pelos momentos de descontração! Sou extremamente grata a vocês.

Ao meu amigo de longa data, Jorge, por toda a ajuda e incentivo a fazer pós-graduação e pelos muitos anos de amizade. Você é um presente que a UFPR me deu!

À todos do laboratório de Farmacologia Gastrointestinal e da Dor, pelo auxílio e execução dos experimentos biológicos.

À Prof. Dr. Élide Santos pela identificação botânica das espécies e pela ajuda com as coletas.

Agradeço também à Elis, Keyla e Rosane pelas análises de HPSEC, GC-MS e GLC e ao centro de RMN da UFPR pelas análises espectroscópicas.

Agradeço imensamente aos animais que foram usados nos experimentos biológicos. As vidas doadas para os experimentos agregam grande valor ao nosso entendimento sobre a ciência, e merecem extrema gratidão.

Ao Programa de Pós-graduação em Bioquímica pela oportunidade de realizar o Mestrado.

Por último, agradeço ao CNPq por financiar meus estudos, ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular e ao Setor de Ciências Biológicas por toda a estrutura, e à Universidade Federal do Paraná e por ser minha segunda casa durante sete anos.

Há de vir o tempo no qual uma pesquisa diligente durante longos períodos revelará coisas que hoje estão ocultas [...]. E por isso esse conhecimento só se desdobrará ao longo de sucessivas eras. Virá um tempo no qual nossos descendentes ficarão espantados com o fato de que não sabíamos de coisas que para eles serão tão evidentes [...]. Muitas descobertas estão reservadas para épocas ainda por vir, quando a lembrança sobre nós estará apagada. Nosso universo é um caso lamentavelmente ínfimo, a menos que encerre coisas que cada época terá de investigar [...]. A natureza não revela seus mistérios de uma só vez.

Sêneca, *Questões naturais*, livro 7, século I

RESUMO

Piper umbellatum e *Piper regnellii* são plantas popularmente conhecidas como pariparoba. São amplamente empregadas na medicina popular para o tratamento de dores, inflamações, úlcera gástrica entre outras aplicações. Este trabalho apresenta a extração, purificação e caracterização dos polissacarídeos presentes nas folhas das duas plantas e a avaliação da atividade anti-inflamatória e anti-nociceptiva de *P. umbellatum*. A partir das folhas de *P. umbellatum*, foi obtida uma fração polissacarídica constituída predominantemente pelos monossacarídeos GalA e Xyl, denominada PU500R. Análises de RMN e metilação indicaram que a fração era constituída de uma homoxilana β -(1 \rightarrow 4) e uma homogalacturonana α -(1 \rightarrow 4). No extrato obtido das folhas de *P. regnellii* foi identificada na fração polissacarídica a presença majoritária de Gal, Ara e GalA. Esta fração apresentou perfil homogêneo de eluição em HPSEC, com um M_w de 164.000 g/mol. As análise de RMN e metilação demonstraram que esta fração é constituída por uma arabinogalactana tipo II (AG-II), formada por uma cadeia principal de β -D-Galp-(1 \rightarrow 3), substituída em O-6 por cadeias laterais de β -D-Galp-(1 \rightarrow 6), que por sua vez são substituídas em O-3 por terminais não redutores de α -L-Araf, e uma ramnogalacturonana tipo I (RG-I), composta por $[\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-D-GalpA-(1}\rightarrow 2)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap-(1}\rightarrow)]_n$. Análise de atividade biológica com a fração PUSGD, derivada do extrato bruto de *P. umbellatum*, apresentou resposta anti-inflamatória e antinociceptiva utilizando dose de 3 mg/kg e a fração PU500R, obtida a partir de PUSGD, demonstrou apenas atividade antinociceptiva na dose testada (0,402 mg/kg). Isso indica que outros compostos presentes nas folhas da planta podem ter propriedade anti-inflamatória. O resultado confirma o uso popular da planta para esta finalidade.

Palavras-chave: *Piper umbellatum*, *Piper regnellii*, polissacarídeos, anti-inflamatória, anti-nociceptiva.

ABSTRACT

Piper umbellatum and *Piper regnellii* are plants popularly known as pariparoba. They are widely used in folk medicine for the treatment of pain, inflammation, gastric ulcer among others. This work presents the extraction, purification and characterization of the polysaccharides present in the leaves of both plants and the evaluation of the anti-inflammatory and anti-nociceptive activity of *P. umbellatum*. From the leaves of *P. umbellatum*, a polysaccharide fraction predominantly constituted by the monosaccharides GalA and Xyl, denominated PU500R, was obtained. NMR and methylation analysis indicated that the fraction consisted of a β -(1 \rightarrow 4) homoxylan and a α -(1 \rightarrow 4) homogalacturonan. In the extract obtained from the leaves of *P. regnellii* the majority presence of Gal, Ara, Rha and GalA was identified in the polysaccharide fraction. This fraction had a homogeneous elution profile in HPSEC, with a M_w of 164,000 g / mol. NMR and methylation analysis demonstrated that the polysaccharides of this fraction consist of a type II (AG-II) arabinogalactan, formed by a β -D-Galp-(1 \rightarrow 3) main chain, substituted at O-6 by side chains of β -D-Galp-(1 \rightarrow 6), which are substituted at O-3 by non-reducing α -L-Araf ends and of a type I rhamnogalacturonan, formed by $[\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-D-GalpA-(1}\rightarrow 2)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap-(1}\rightarrow]_n$. The biological test with the PUSGD fraction, derived from the crude extract of *P. umbellatum*, showed anti-inflammatory and antinociceptive response using a dose of 3 mg/kg and the PU500R fraction obtained from PUSGD showed only antinociceptive activity at a dose of 0.402 mg/kg. Other compounds present in the leaves of the plant may have anti-inflammatory properties. The result confirms the popular use of the plant for this purpose.

Keywords: *Piper umbellatum*, *Piper regnellii*, polysaccharides, anti-inflammatory, anti-nociceptive.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 –	<i>Piper umbellatum</i>	20
FIGURA 2 –	COMPOSTOS FITOQUÍMICOS PRESENTES EM <i>P. umbellatum</i>	21
FIGURA 3 –	<i>Piper regnellii</i>	23
FIGURA 4 –	COMPARAÇÃO MORFOLÓGICA ENTRE AS ESPÉCIES <i>P. regnellii</i> e <i>P.umbellatum</i>	24
FIGURA 5 –	ESTRUTURAS QUÍMICAS DE COMPOSTOS PRESENTES NAS FOLHAS DE <i>P. regnellii</i>	25
FIGURA 6 –	MODELO DE PAREDE CELULAR PRIMÁRIA TIPO I.....	27
FIGURA 7 –	ESTRUTURA BÁSICA DE UMA RAMNOGALACTURONANA TIPO I E UMA ARABINOGALACTANA TIPO I.....	30
FIGURA 8 –	ESTRUTURA BÁSICA DE UMA ARABINOGALACTANA TIPO II....	31
FIGURA 9 –	ESQUEMA DO PROCESSO INFLAMATÓRIO AGUDO, SEUS COMPONENTES E FUNÇÕES.....	34
FIGURA 10 –	NOCICEPÇÃO.....	35
FIGURA 11 –	FLUXOGRAMA DO PROCEDIMENTO DE EXTRAÇÃO AQUOSA E PURIFICAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS DE <i>P. umbellatum</i>	47
FIGURA 12 –	PERFIL DE ELUIÇÃO EM HPSEC COM DETECTOR DE ÍNDICE DE REFRAÇÃO (RID) DA FRAÇÃO PUSGD.....	48
FIGURA 13 –	PERFIS DE ELUIÇÃO EM HPSEC COM DETECTOR DE ÍNDICE DE REFRAÇÃO DAS FRAÇÕES PU30E, PU30R, PU300E E PU300R.....	49
FIGURA 14 –	PERFIL DE ELUIÇÃO EM HPSEC COM DETECTOR DE ÍNDICE DE REFRAÇÃO DA FRAÇÃO PU500R.....	50
FIGURA 15 –	TLC DA AMOSTRA PUSGD HIDROLISADA (TFA 2M , 8h a 100°C).....	52
FIGURA 16 –	MAPA DE CORRELAÇÃO DIRETA ¹³ C- ¹ H (HSQC) DA FRAÇÃO PU500R EM D ₂ O.....	54
FIGURA 17 –	MAPA DE CORRELAÇÃO DIRETA ¹³ C- ¹ H (HSQC) DA FRAÇÃO	

PU500R em DMSO-d ₆	55
FIGURA 18 – PERFIL DE FRAGMENTAÇÃO OBTIDO DO DERIVADO METILADO 2,3-Me ₂ -Xyl (OBSERVADO NA ANÁLISE DE METILAÇÃO DE PU500R.....	57
FIGURA 19 – FLUXOGRAMA DO PROCEDIMENTO DE EXTRAÇÃO AQUOSA E PURIFICAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS DE <i>P. regnellii</i>	58
FIGURA 20 – PERFIL DE ELUIÇÃO EM HPSEC UTILIZANDO DETECTOR DE ÍNDICE DE REFRAÇÃO (RID) DA FRAÇÃO PRSGD.....	59
FIGURA 21 – PERFIS DE ELUIÇÃO EM HPSEC UTILIZANDO DETECTOR DE ÍNDICE DE REFRAÇÃO (RID) DAS FRAÇÕES PR30E E PR30R...60	
FIGURA 22 – TLC DA FRAÇÃO PRWP HIDROLISADA (TFA 2M, 8h a 100°C).....	62
FIGURA 23 – MAPA DE CORRELAÇÃO DIRETA ¹³ C- ¹ H (HSQC) DA FRAÇÃO PR30R.....	65
FIGURA 24 – ESTRUTURAS SUGERIDAS PARA OS POLISSACARÍDEOS ISOLADOS NA FRAÇÃO PR30R.....	67
FIGURA 25 – EFEITO DA INJEÇÃO INTRAPERITONEAL DE PUSGD E PU500R EM CAMUNDONGOS.....	68
FIGURA 26 – EFEITO DA INJEÇÃO INTRAPERITONEAL DE PUSGD E PU500R NO EXTRAVASAMENTO PLASMÁTICO INDUZIDO POR ÁCIDO ACÉTICO EM CAMUNDONGOS.....	69
FIGURA 27 – EFEITO DA INJEÇÃO INTRAPERITONEAL DE PUSGD E PU500R NA MIGRAÇÃO CELULAR INDUZIDA POR ÁCIDO ACÉTICO EM CAMUNDONGOS.....	70

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 –	RENDIMENTO DAS FRAÇÕES ORIGINADAS A PARTIR DA EXTRAÇÃO AQUOSA DAS FOLHAS DE <i>P. umbellatum</i>	51
TABELA 2 –	COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES DERIVADAS EXTRAÇÃO AQUOSA DAS FOLHAS DE <i>umbellatum</i>	53
TABELA 3 –	ACETATOS DE ALDITÓIS PARCIALMENTE METILADOS OBTIDOS POR ANÁLISE DE METILAÇÃO DE PU500R.....	56
TABELA 4 –	RENDIMENTO DAS FRAÇÕES ORIGINADAS A PARTIR DA EXTRAÇÃO AQUOSA DAS FOLHAS DE <i>P. regnellii</i>	61
TABELA 5 –	COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES OBTIDAS A PARTIR DA EXTRAÇÃO AQUOSA DAS FOLHAS DE <i>P. regnellii</i>	63
TABELA 6 –	ACETATOS DE ALDITÓIS PARCIALMENTE METILADOS OBTIDOS POR ANÁLISE DE METILAÇÃO DE PR30R.....	66

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

δ	Deslocamento químico
4-O-Me- α -D-GalpA	4-O-Metil- α -D-ácido galacturônico
AG I	Arabinogalactana tipo I
AG II	Arabinogalactana tipo II
Ara	Arabinose
CH ₃ I	Iodeto de metila
D ₂ O	Óxido de deutério
DEPT-135	<i>Distortionless enhancement by polarization transfer</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMSO-d ₆	Dimetilsulfóxido deuterado
dn/dc	Taxa de variação do índice de refração com relação à concentração
<i>f</i>	Furanosídico
Gal	Galactose
GalA	Ácido galacturônico
GalAe	Ácido galacturônico esterificado
GC-MS	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
Glc	Glucose
HPSEC	Cromatografia de exclusão estérica de alta eficiência
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
HCl	Ácido clorídrico
HSQC	<i>Heteronuclear single quantum correlation spectroscopy</i>
i.p.	Intraperitoneal
<i>m/z</i>	Razão massa por carga
Man	Manose
Me	Grupamento metil (CH ₃)
Mw	<i>Mass weight</i>
NaBD ₄	Boroidreto de sódio deuterado

NaBH ₄	Boroidreto de sódio
NaN ₃	Azida
NaNO ₂	Nitrito de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
<i>p</i>	Piranosídico
ppm	Partes por milhão
p/v	Peso por volume
RG I	Ramnogalacturonana tipo I
RG II	Ramnogalacturonana tipo II
Rha	Ramnose
RID	Detector de índice de refração
rpm	Rotação por minuto
TFA	Ácido trifluoroacético
tR	Tempo de retenção
v/v	Volume por volume
Xyl	Xilose

SUMARIO

1 INTRODUÇÃO	19
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	21
2.1 <i>PIPER UMBELLATUM</i>	21
2.1.1 ASPECTOS BOTÂNICOS.....	21
2.1.2 FITOQUÍMICA.....	22
2.1.3 ATIVIDADE BIOLÓGICA.....	23
2.1.3.1 ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA.....	24
2.2 <i>PIPER REGNELLII</i>	25
2.2.1 ASPECTOS BOTÂNICOS.....	25
2.2.2 FITOQUÍMICA.....	27
2.2.3 ATIVIDADES DE <i>P. regnellii</i>	28
2.3 CARBOIDRATOS DE PLANTAS	28
2.3.1 PAREDE CELULAR	28
2.3.2 PECTINAS	30
2.3.2.1 HOMOGALACTURONANAS.....	31
2.3.2.2 RAMNOGALACTURONANA TIPO I	31
2.3.2.3 ARABINO GALACTANAS	32
2.3.3 HEMICELULOSES.....	33
2.3.3.1 XILANAS.....	34
2.4 AÇÕES BIOLÓGICAS DE POLISSACARÍDEOS DE PLANTAS.....	34
2.5 INFLAMAÇÃO	35
3 OBJETIVOS.....	39
3.1 OBJETIVO GERAL.....	39
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	39
4 MATERIAIS E MÉTODOS	40
4.1 MATERIAIS BOTÂNICOS	40
4.2 EXTRAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS	40
4.3 PURIFICAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS.....	40
4.3.1 FRACIONAMENTO DOS POLISSACARÍDEOS POR CONGELAMENTO E DEGELO	40
4.3.2 FRACIONAMENTO DOS POLISSACARÍDEOS POR ULTRAFILTRAÇÃO	41

4.3.3	FRACIONAMENTO DOS POLISSACARÍDEOS POR DIÁLISE	41
4.3.4	FRACIONAMENTO DOS POLISSACARÍDEOS POR SOLUBILIDADE	42
4.4	ANÁLISE ESTRUTURAL DE POLISSACARÍDEOS	42
4.4.1	COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA	42
4.4.1.1	HIDRÓLISE DOS POLISSACARÍDEOS	42
4.4.1.2	REDUÇÃO DOS MONOSSACARÍDEOS A ALDITOIS	42
4.4.1.3	ACETILAÇÃO DOS ALDITOIS	43
4.5	METILAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS	43
4.6	MÉTODOS ANALÍTICOS	44
4.6.1	TESTE DE HOMOGENEIDADE E DETERMINAÇÃO DA MASSA MOLECULAR	44
4.6.2	CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (TLC)	45
4.6.3	GC-MS	45
4.6.4	RMN	45
4.6.5	DOSAGEM DE ÁCIDOS URÔNICOS	46
4.6.6	DETERMINAÇÃO DE AÇÚCARES TOTAIS	46
4.7	TESTES DE ATIVIDADE BIOLÓGICA ANTI-INFLAMATÓRIA	46
4.7.1	ANIMAIS	46
4.7.2	AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTINOCICEPTIVO DA ADMINISTRAÇÃO INTRAPERITONEAL DE PUSGD E PU500R NO MODELO DE CONTORÇÕES ABDOMINAIS INDUZIDAS PELA INJEÇÃO DE ÁCIDO ACÉTICO	47
4.7.3	ANÁLISE ESTATÍSTICA	47
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
5.1	RESULTADOS DE <i>P. umbellatum</i>	49
5.1.1	EXTRAÇÃO E FRACIONAMENTO DOS POLISSACARÍDEOS	49
5.2.2	CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DOS POLISSACARÍDEOS	53
5.2.2.1	COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA E TLC	53
5.2.2.2	ANÁLISE DE RMN DE CORRELAÇÃO DIRETA ^{13}C - ^1H (HSQC)	55
5.2.2.3	ANÁLISE DE METILAÇÃO	58
5.2	RESULTADOS DE <i>P. regnellii</i>	60
5.2.1	EXTRAÇÃO E FRACIONAMENTO DOS POLISSACARÍDEOS	60
5.2.2	CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DOS POLISSACARÍDEOS	63
5.2.2.1	COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA	63
5.2.2.2	ANÁLISE DE RMN DE CORRELAÇÃO DIRETA ^{13}C - ^1H (HSQC)	65
5.2.2.3	ANÁLISE DE METILAÇÃO	67
5.3	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DOS EXTRATOS DE <i>P.umbellatum</i>	69

5.3.1 ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DAS FRAÇÕES PUSGD E PU500R	69
6 CONCLUSÃO	75
REFERÊNCIAS	76

1 INTRODUÇÃO

As plantas medicinais apresentam registros de utilização milenar, sendo sua aplicação uma prática comum há mais de 4000 anos no tratamento de diversas enfermidades e, por muito tempo, representou a principal fonte de medicamentos (RATES, 2001; DUTRA *et al.*, 2016; RASKIN *et al.*, 2002). Os primeiros registros de utilização de plantas medicinais foram encontrados na Mesopotâmia e datam de aproximadamente 2600 a.C.. A medicina egípcia, em 1500 a.C., baseava-se no “*Ebers Papyrus*” – ou Papiro Ebers –, tratado médico que relacionava mais de 700 drogas de origens vegetal, animal e mineral. Ao longo dos séculos, diversos outros documentos farmacopeicos, incluindo plantas e outras matérias, foram redigidos conforme início de seus usos medicinais e novas descobertas (NEWMAN *et al.*, 2000). No entanto, o uso das plantas medicinais entrou em declínio com a ascensão da indústria farmacêutica no século XIX, marcada pela descoberta da salicina por Rafaele Piria, em 1832. Em 1897, a salicina foi modificada quimicamente na forma de ácido acetilsalicílico e foi largamente empregada como agente contra dores e febre (RATES, 2001; DUTRA *et al.*, 2016). Entretanto, o uso de terapias alternativas, incluindo a fitoterapia, tem recebido grande interesse recentemente, uma vez que fármacos sintéticos podem apresentar inconvenientes como ineficiência, efeitos colaterais indesejados e dificuldade de acesso (RATES, 2001). Em função deste fator, a pesquisa e o interesse por novas plantas e novos compostos biologicamente ativos vêm crescendo consideravelmente. No período entre 1987 e 2015, a pesquisa brasileira em relação ao tópico desenvolveu-se significativamente, sendo que entre 2011 e 2013, mais de 10.000 artigos científicos sobre plantas medicinais foram publicados por cientistas brasileiros. O número absoluto de manuscritos dentro deste período foi contabilizado em 34.614. (DUTRA *et al.*, 2016).

Em países em desenvolvimento, 85% da população utiliza plantas medicinais para atender cuidados básicos em saúde, como terapia alternativa ou associando-a à medicina tradicional (ROSA *et al.*, 2011). O Brasil possui uma das maiores biodiversidades do mundo, e a população brasileira recorre frequentemente ao emprego de plantas medicinais, por vezes como único recurso terapêutico, para o tratamento tanto de condições clínicas agudas quanto crônicas (DUTRA *et al.*,

2016). Por esse motivo, o Brasil representa uma grande fonte de produtos naturais e biologicamente ativos, despertando grande interesse na pesquisa por novos compostos e suas aplicações.

Conhecidas popularmente como pariparoba, as espécies *Piper umbellatum* e *Piper regnellii* são utilizadas na medicina popular (LORENZI e MATOS, 2008). São consumidas principalmente na forma de chás de inflorescências, folhas e/ou raízes e emplastos no tratamento de inflamações, queimaduras, dores de cabeça, anti-úlceras gástricas, entre outras aplicações (ROERSCH, 2010; DI STASI, 1989).

As biomoléculas oriundas do metabolismo primário e/ou secundário das plantas são as responsáveis pelas suas ações terapêuticas. Quando um medicamento fitoterápico, chá medicinal ou outras formas farmacêuticas fitoterapêuticas são administradas, ocorre a ingestão destes compostos bioativos. Entre os metabólitos primários, pode-se citar os polissacarídeos. Os polissacarídeos, por apresentarem atividade biológica, representam uma importante classe de metabólitos que podem ser utilizados na farmacoterapêutica de diversas condições clínicas (SIMOES, 2003). Estudos anteriores demonstram que os polissacarídeos apresentam atividade antioxidante (NERGARD *et al.*, 2005), anti-inflamatória (CARBONERO *et al.*, 2008) gastroprotetora (NASCIMENTO *et al.*, 2013; JUNGLES *et al.*, 2014; CIPRIANI *et al.*, 2006), entre outras.

Considerando a necessidade de identificar as biomoléculas de produtos naturais, este trabalho teve como objetivo isolar e caracterizar polissacarídeos de folhas de *Piper regnellii* e *Piper umbellatum* e investigar se polissacarídeos de *Piper umbellatum* apresentam efeito anti-inflamatório.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *PIPER UMBELLATUM*

Trata-se de uma espécie amplamente distribuída ao redor do mundo. É encontrada no México, na América do Sul e nas ilhas do oeste indiano naturalmente e foi naturalizada em regiões como África e sudeste asiático. No Brasil, é encontrada em diferentes regiões geográficas, entre elas Amazônia, Cerrado e Floresta Atlântica (SCHMELZER, 2001).

2.1.1 ASPECTOS BOTÂNICOS

A espécie *Piper umbellatum* (FIGURA 1), sinônimos *Pothomorphe umbellata* (L.) Miq., *Pothomorphe dombeyana* Miq., *Pothomorphe subpeltata* (Willd.) Miq., *Pothomorphe subpeltata* (Willd.) Miq., *Pothomorphe dombeyana* Miq., *Lepianthes umbellata* (L.) Raf., *Heckeria umbellata* (L.) Kunth., *Heckeria subpeltata* (Willd.) Kunth, *Peperomia umbellata* (L.) Kunth, *Piper subpeltatum* Willd., *Piper postelsianum* Maxim, e *Piper peltatum* Ruiz & Pav, é chamada popularmente de pariparoba, caapeba, capeba entre outros, e pertence à família *Piperaceae* (LORENZI e MATOS, 2008). É conhecida também como a pariparoba verdadeira.

Com relação a suas características botânicas, *Piper umbellatum* é uma planta trepadeira arbustiva, perene, que apresenta desde 1 a 2,5 metros de altura. As raízes são lenhosas, os caules são numerosos e reúnem-se em aglomerados. As folhas são alternadas, com formato circular a reniforme; sua base é cordada, o ápice é acuminado, é densamente inervada e tem tamanho de até 5-40 cm x 5-40 cm. A lâmina superior apresenta coloração verde escura e a inferior acinzentada. Dispõe de inflorescências que variam de 5,5 cm a 15 cm, organizadas em 2 a 8 falsas umbelas, de cor esverdeada a acinzentada. Os pedúnculos das inflorescências são dispostos juntos de 1 a 3 unidades, e apresentam 3 a 12 cm de comprimento. As flores são hermafroditas e pequenas. Os frutos são drupas, obpiramidais e a semente é marrom e globosa (SCHMELZER, 2001; ROERSCH, 2010).



FIGURA 1: *Piper umbellatum* (LORENZI e MATOS, 2008).

2.1.2 FITOQUÍMICA

Estudos fitoquímicos de *P. umbellatum* demonstraram a presença de terpenos, como o (6S,9S)-roseosídeo e o (6S,9R)-roseosídeo, os quais são terpenos glicosilados (BALDOQUI *et al.*, 2009), alcaloides, como as piperumbelactamas A, B, C e D, as quais foram isoladas a partir de ramos de *P. umbellatum* (TABOPDA, 2008), flavonas, como o C-glicosilflavona-O-glicosídeo e vitexina 2''-O-β-D-glucopiranosídeo (BALDOQUI *et al.*, 2009), esteróis, flavonoides entre outros metabólitos secundários.

O composto bioativo considerado como componente principal, que vem mostrado grande relevância biológica é o 4-nerolidilcatecol (FIGURA 2), encontrado em todas as partes da planta (REZENDE *et al.*, 2004). Foi inicialmente isolado em estudo realizado por Kijjoa *et al.* (1980) com extrato hexânico obtido a partir de folhas e raízes da planta. Nesse estudo, a estrutura sesquiterpenoide com porção

catecol da molécula foi elucidada. O 4-nerolidilcatecol foi avaliado quanto a atividade antioxidante e como antídoto para picadas de cobra, e mostrou-se eficiente para estas finalidades (ROPKE *et al.*, 2003). Outra molécula de interesse biológico, N-benzoilmescalina (FIGURA 2), isolada por Isobe *et al.* (2002) no extrato benzênico, demonstrou ter atividade antimicrobiana contra *Helicobacter pylori*.

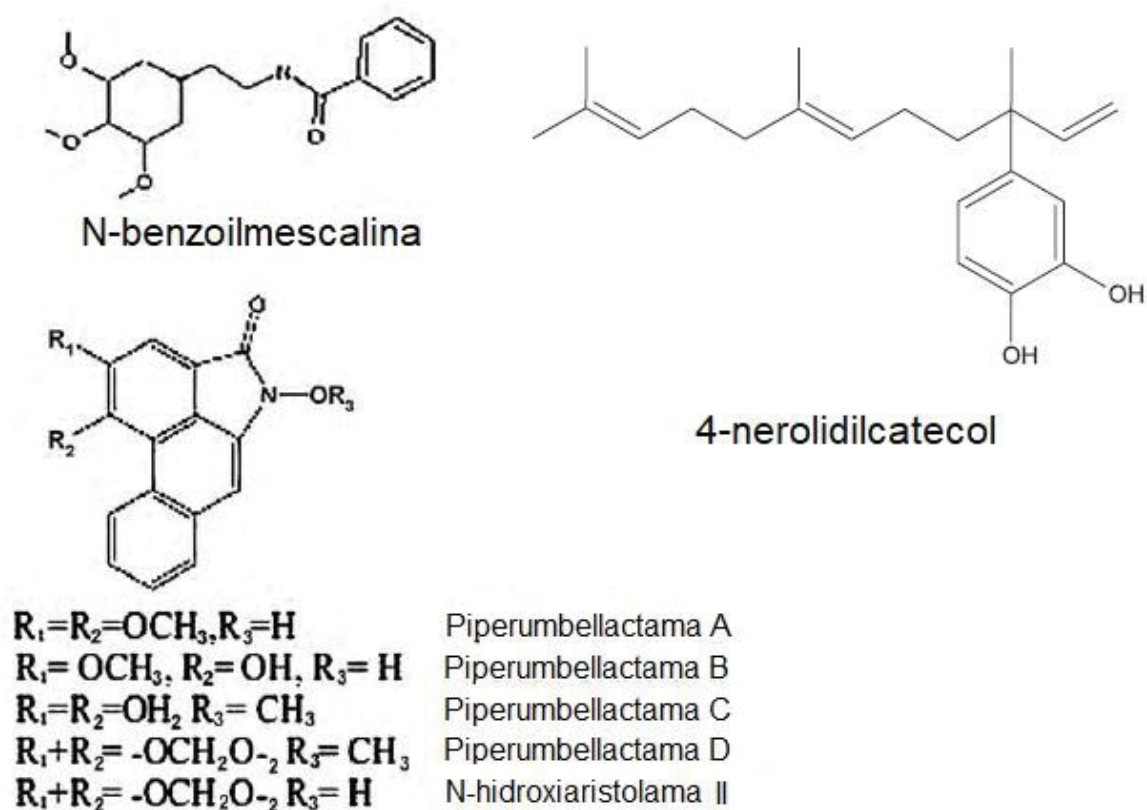


FIGURA 2: COMPOSTOS FITOQUÍMICOS PRESENTES EM *P. umbellatum*. (ROERSCH, 2010; adaptado de BERGAMO *et al.*, 2005).

2.1.3 ATIVIDADE BIOLÓGICA

De acordo com Roersch (2010), existem aproximadamente 94 usos medicinais distintos para *P. umbellatum*, distribuídos em diferentes culturas. Há registro de aplicação em afecções do trato urinário, digestivas, do trato respiratório, distúrbios da pele, entre outras. É geralmente consumida na forma de chás, decocto

e infuso, das folhas, raízes e inflorescências mas também é utilizada na forma de cataplasma e emplastro.

Estudos anteriores mostraram que os compostos bioativos previamente isolados de *P. umbellatum* abrangem um grande espectro de atividades biológicas, como ação antibactericida (JUNIOR *et al.*, 2014), antioxidante, antiaterogênica (AGBOR *et al.*, 2012), citotóxica (LOPES *et al.*, 2013; SACOMAN *et al.*, 2008), antitumoral (SACOMAN *et al.*, 2008; IWAMOTO *et al.*, 2015), anti-inflamatória (IWAMOTO *et al.*, 2015) entre diversas outras aplicações. A planta também é utilizada popularmente como antídoto contra picadas de cobra (NÚÑEZ *et al.*, 2005). Bieski *et al.* (2012), verificaram em estudo etnofarmacológico que as infusões da pariparoba são frequentemente utilizadas para distúrbios estomacais, do fígado e pneumonia. A atividade gastroprotetora do extrato etanólico foi verificada por Junior *et al.* (2016), que observaram a redução da úlcera gástrica em todas as doses testadas, através de diferentes mecanismos de ação.

2.1.3.1 ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA

Roersch (2010) demonstrou em seu estudo acerca da planta que existem indicações de usos em nove países diferentes (Brasil, Cuba, República Dominicana, Haiti, Nigéria, Camarões, Costa do Marfim, Gabão e México) com a finalidade de tratamento de dor. A planta é empregada como anti-inflamatória no Brasil, México e Cuba.

A atividade anti-inflamatória de *P. umbellatum* já foi previamente verificada em outros estudos. Em estudo realizado por Perazzo *et al.*, (2005) o extrato hidroalcoólico de partes aéreas de pariparoba foi testado no modelo de edema de pata induzido por carragenina em ratos, por um período de 4 horas. Foi evidenciada a diminuição significativa do edema de maneira dose-dependente, sendo a dose efetiva (DE₅₀) calculada em 555.0 mg/kg. Na terceira hora da experimentação, o extrato teste foi capaz de reduzir o edema em 48,7%. A avaliação da toxicidade aguda demonstrou ausência de sinais relacionados a toxicidade e a dose letal (DL₅₀) determinada foi de 2.0 g/kg.

Em outro estudo realizado por Iwamoto *et al.* (2015), o extrato diclorometanólico foi testado quanto a potencial atividade anti-inflamatória no modelo de edema de pata induzido por carragenina em ratos das folhas de *P. umbellatum*. Os autores demonstraram que houve diminuição significativa do edema, independente da dose, na primeira fase da inflamação aguda. A dose de 400 mg/kg também foi capaz de inibir a segunda fase da inflamação.

2.2 PIPER REGNELLII

A espécie *Piper regnellii* (FIGURA 3) é uma planta arbustiva pertencente à família *Piperaceae* e proveniente de regiões tropicais e subtropicais. É conhecida popularmente como pariparoba, assim como *P. umbellatum*. Diversas espécies da família *Piperaceae* são chamadas usualmente de “pariparoba” e todas apresentam propriedades medicinais (BARDELLI *et al.*, 2008).

2.2.1 ASPECTOS BOTÂNICOS

Apresenta-se como um arbusto que varia de 1 a 4 metros de altura. Possui folhas longo-pecioladas, ovalada e cordiforme, com o ápice acuminado e base cordada. As suas inflorescências são dispostas de forma isolada, variando entre 4,5 a 11 cm de comprimento. Por serem espécies com morfologia vegetal muito similares, a distinção de *P. regnellii* e *P. umbellatum* se dá principalmente na disposição das inflorescências – isoladas na primeira e agrupadas na última – (FIGURA 4). Em adição, *P. regnellii* possui forma e venação da lâmina foliar característica (acródoma broquidódroma) que permite sua discriminação e identificação (BARDELLI *et al.*, 2008).



FIGURA 3: *Piper regnellii*. Fonte: <http://www.pybio.org/en/3333/piperaceae/>

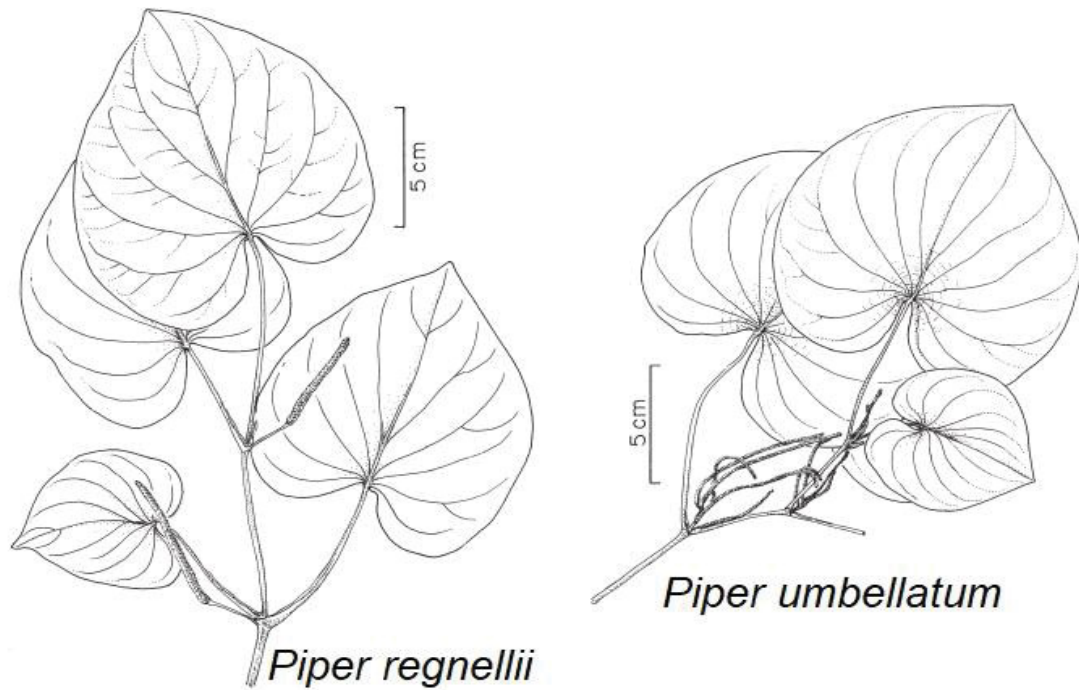


FIGURA 4: COMPARAÇÃO MORFOLÓGICA ENTRE AS *P. regnellii* e *P. umbellatum* (BARDELLI et al., 2008).

2.2.2 FITOQUÍMICA

P. regnellii apresenta tanto nas folhas como nas raízes moléculas com núcleo fenilpropanoide. Em extrato acetoacetílico das raízes da planta, Pessini *et al.*, (2003) fracionaram cromatograficamente uma mistura de lignanas, isolando os compostos eupomatenoide-6, eupomatenoide-5, eupomatenoide-3 e conocarpano (FIGURA 5). Benevides *et al.*, (1999) mostraram essas estruturas como sendo neolignanas, as quais não apresentam nenhuma função orgânica oxigenada no carbono gama, diferindo assim de outros lignóides.

Em relação a estudos visando a pesquisa de carboidratos na planta, não foi encontrada nenhuma referência descritiva destas moléculas.

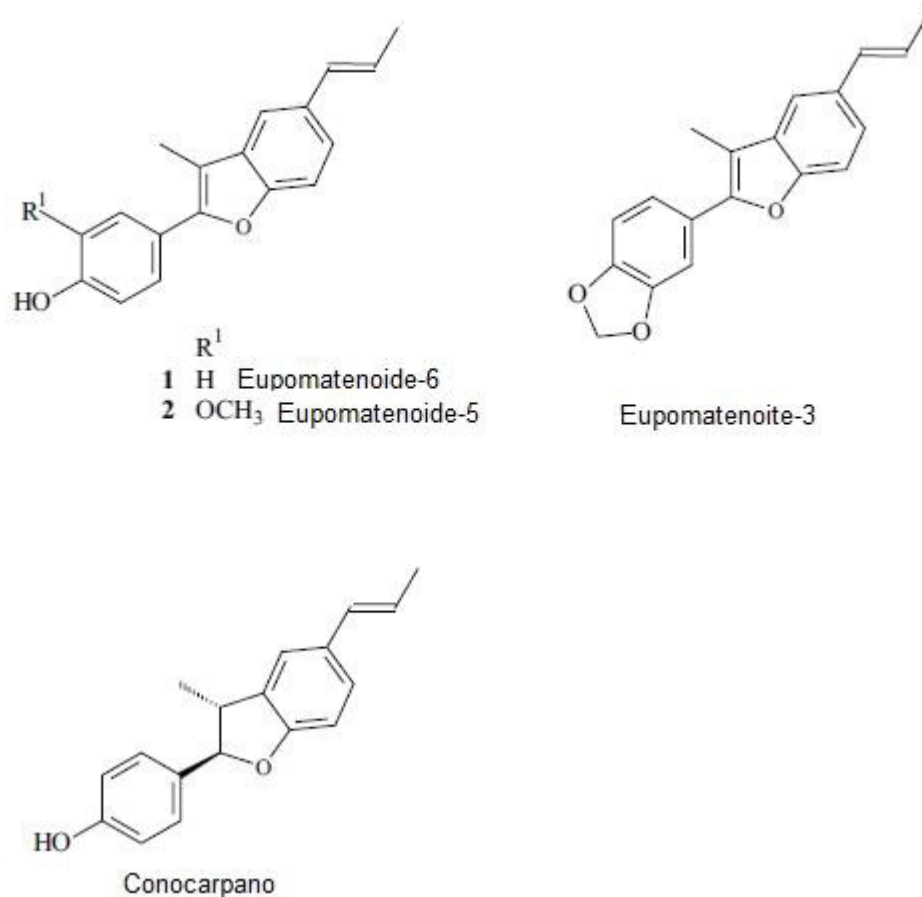


FIGURA 5: ESTRUTURAS QUÍMICAS DE COMPOSTOS PRESENTES NAS FOLHAS DE *P. regnellii* (PESSINI *et al.*, 2005).

2.2.3 ATIVIDADES DE *P. regnellii*

Estudos anteriores avaliaram diferentes atividades biológicas de *P. regnellii*. Scodro *et al.*, (2013) verificaram em extratos de CO₂ supercrítico contendo neolignanas como eupomatenóide-5, conocarpano e eupomatenóide-3 a atividade antituberculose. Foi verificada atividade antimicrobiana do óleo essencial da planta contra *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans* (COSTANTIN, *et al.*, 2001) e de eupomatenóide-5 contra *Leishmania amazonensis* (GARCIA *et al.*, 2013) e *Trypanosoma cruzi* (LUIZE *et al.*, 2006). Em outras pesquisas, foi observada atividade antifúngica (KOROISHI *et al.*, 2008), antitumoral (LONGATO *et al.*, 2011), antibacteriana (PESSINI *et al.*, 2003), entre outras.

2.3 CARBOIDRATOS DE PLANTAS

Depois da água, os carboidratos são os principais componentes químicos constituintes dos tecidos vegetais (REID, 1997). Existem na forma de monossacarídeos, dissacarídeos, oligossacarídeos, polissacarídeos e seus derivados. A natureza das ligações dos carboidratos complexos e sua estrutura refletem sua influência fisiológica sobre a planta (AVIGAD e DEY, 1997).

De acordo com a sua função, os carboidratos podem ser classificados em dois grandes grupos: estruturais e de reserva. Os carboidratos estruturais são responsáveis pela formação da parede celular e de outras estruturas, sendo considerados os compostos orgânicos mais abundantes do planeta Terra (REID, 1997).

2.3.1 PAREDE CELULAR

A parede celular é crucial para a sobrevivência das plantas. Sua estrutura sofre modificações para acomodar o estágio de desenvolvimento da planta e se adaptar às condições ambientais nas quais a planta está inserida (CAFFALL *et al.*, 2009). É a parte mais externa da célula vegetal e atua na proteção da membrana

plasmática, manutenção da pressão osmótica celular, transporte de moléculas, crescimento da célula, entre outras funções.

A parede celular vegetal é dinâmica, mudando ao longo da vida da célula. A medida que as células meristemáticas aumentam em tamanho e comprimento, mais materiais são incorporados na parede celular primária. A lamela média é uma interface entre as paredes celulares de células vizinhas. Conforme as células se diferenciam, se forma uma parede secundária, abrangendo estruturas mais complexas que são intrínsecas à atividade da célula (CARPITA *et al.*, 2015).

A composição da parede celular também é variável de acordo com os grupos taxonômicos, com o material vegetal do qual é extraída e em relação ao desenvolvimento primário ou secundário da parede (REID, 1997). Carpita e Gibeaut (1993) descreveram dois modelos de parede celular primária para angiospermas. Paredes do tipo I apresentam grande quantidade de pectina e hemicelulose, e estão presentes em dicotiledôneas e monocotiledôneas, com exceção das gramíneas. Neste tipo de parede celular, as microfibrilas de celulose encontram-se envolvidas por xiloglucanas, estrutura que por sua vez está envolvida em uma matriz de pectina. Um modelo deste tipo de parede primária está demonstrado na FIGURA 6. Já as paredes tipo II estão presentes nas gramíneas, e contém pouca pectina e mais hemicelulose em sua estrutura. Aqui, as microfibrilas de celulose apresentam-se entrelaçadas por glucuronoarabinoxilanas e apenas uma pequena quantidade de pectina constitui a matriz (CARPITA e GIBEAUT, 1993; CARPITA *et al.*, 2015).

De maneira prática, os carboidratos da parede celular podem ser categorizados quanto à sua solubilidade: as pectinas podem ser extraídas por meio de solução aquosa contendo quelante de cálcio, como oxalato de amônio ou EDTA (DEY, 1997; CARPITA *et al.*, 2015), e as hemiceluloses são removidas da parede celular através de soluções concentradas de hidróxido de sódio ou potássio. O material remanescente após a extração de pectinas e hemiceluloses apresenta como componente principal do conteúdo de carboidratos a celulose, também entendida como polímero insolúvel em solução alcalina (CARPITA *et al.*, 2015).

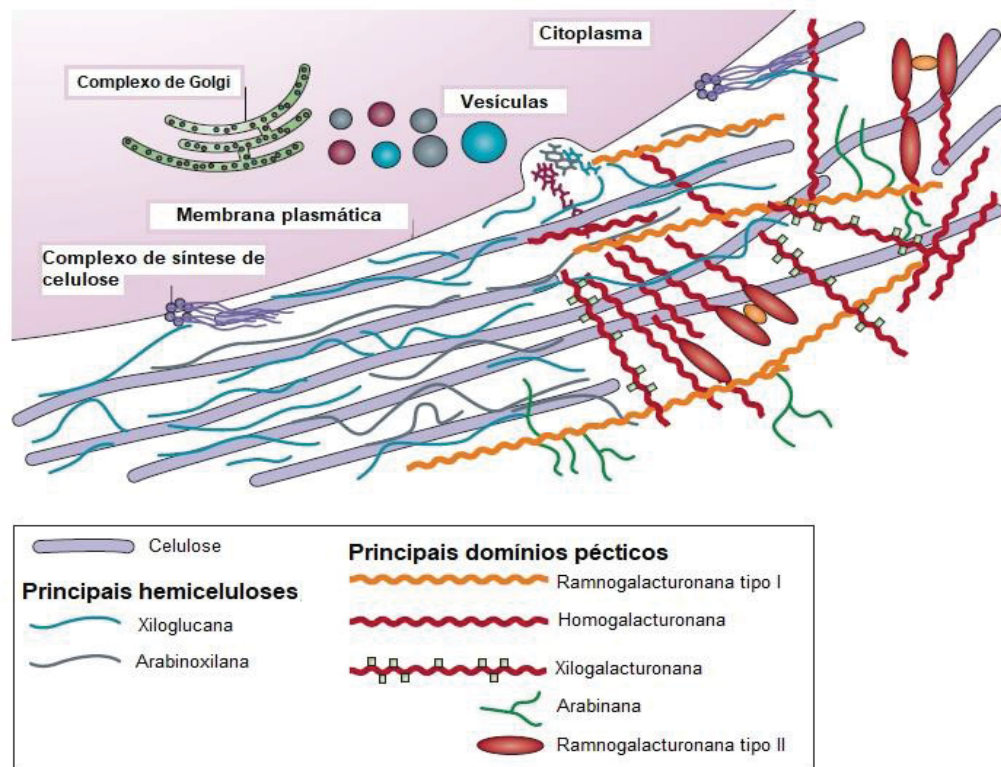


FIGURA 6: MODELO DE PAREDE CELULAR PRIMÁRIA TIPO I (adaptado de COSGROVE, 2005).

2.3.2 PECTINAS

As pectinas são polissacarídeos de ocorrência natural em frutas e plantas, com aplicação comercial na produção de geleias pela sua capacidade de formação de gel (REID, 1997). Nas plantas, as pectinas regulam a adesão célula-célula na lamela média e são moléculas de reconhecimento de presença de organismos simbióticos, patógenos ou insetos (CARPITA *et al.*, 2015).

Os polissacarídeos pécticos representam uma classe de moléculas contendo grande proporção de unidades α -D-GalpA, conectadas por ligações glicosídicas do tipo α -(1 \rightarrow 4), em sua cadeia polimérica. Os principais representantes dessa classe são as homogalacturonanas (HG), as xilogalacturonanas (XGA), ramnogalacturonanas tipo I (RG-I), as ramnogalacturonanas tipo II (RG-II) e arabinogalactanas tipos I (AG-I) e II (AG-II) (CAFFALL *et al.*, 2009; RIDLEY *et al.*, 2001).

2.3.2.1 HOMO GALACTURONANAS

As homogalacturonanas (HG) são polissacarídeos lineares de resíduos de α -D-GalpA, unidos por ligação α -(1 \rightarrow 4). Unidades de ácido galacturônico podem, na estrutura polissacarídica, estarem metilesterificados na carboxila C-6 e podem ser O-acetilados em C-2 ou C-3. Estas modificações químicas variam entre espécies vegetais (RIDLEY *et al.*, 2001). Existem dois tipos mais conhecidos de homogalacturonanas modificadas estruturalmente: as xilogalacturonanas, que são homogalacturonanas substituídas na cadeia principal na posição C-3 por unidades de D-xilose; e as ramnogalacturonanas tipo II (RG-II) (CARPITA *et al.*, 2015; CAFFALL *et al.*, 2009). As RG-II apresentam uma estrutura complexa, com cadeia principal formada por resíduos de α -D-GalpA unidos por ligação α -(1 \rightarrow 4) e cadeias laterais de doze tipos diferentes de açúcar, unidos por vinte tipos diferentes de ligação. Apesar da sua complexidade, a conservação desse polissacarídeo nas plantas indica que RG-II deve ter uma função importante na parede celular, mesmo estando presente em baixa quantidade (CAFFALL *et al.*, 2009). Entre os diversos tipos de açúcares que este polissacarídeo contém, estão inclusos apiose, ácido acérico (3-C-carboxi-5-deoxi-L-xilose), 2-O-metil-fucose, 2-O-metil-xilose entre outros (CAFFALL *et al.*, 2009). Os dímeros de RG-II são conectados por borato através de duas ligações diéster por átomo de boro (CARPITA *et al.*, 2015).

2.3.2.2 RAMNO GALACTURONANA TIPO I

A ramnogalacturonana tipo I tem sua cadeia principal constituída por [\rightarrow 4) α -D-GalpA-(1 \rightarrow 2)- α -L-Rhap-(1 \rightarrow)]_n (FIGURA 7). É possível que os carbonos 2 e/ou 3 de GalpA sejam acetilados. Além disso, unidades de ácido galacturônico podem ser metilesterificadas na carboxila C-6 (KOMALAVILAS e MORT, 1989). Nesta cadeia pode haver a ramificação na posição O-4 por arabinanas, galactanas ou arabinogalactanas (CARPITA *et al.*, 2015). A presença dessas estruturas nas cadeias laterais, juntamente com o comprimento delas, variam de acordo com o método de extração (com ácido cítrico, nítrico, clorídrico ou extração aquosa) e com a fonte vegetal da qual foi extraída (RIDLEY *et al.*, 2001).

2.3.2.3 ARABINO GALACTANAS

As arabinogalactanas podem ser classificadas em tipos I e II, e diferem de acordo com as ligações químicas envolvidas na formação da cadeia principal destes polímeros. O tipo I é caracterizado por uma cadeia principal de (1→4)-β-D-galactana, e o tipo II apresenta uma cadeia principal formada por (1→3) e (1→6)-β-D-galactana (ASPINALL, 1973).

As arabinogalactanas do tipo I (FIGURA 7) são encontradas unicamente em frações pécicas e apresentam unidades arabinosil ligadas na posição O-3 da galactana (CARPITA *et al.*, 2015).

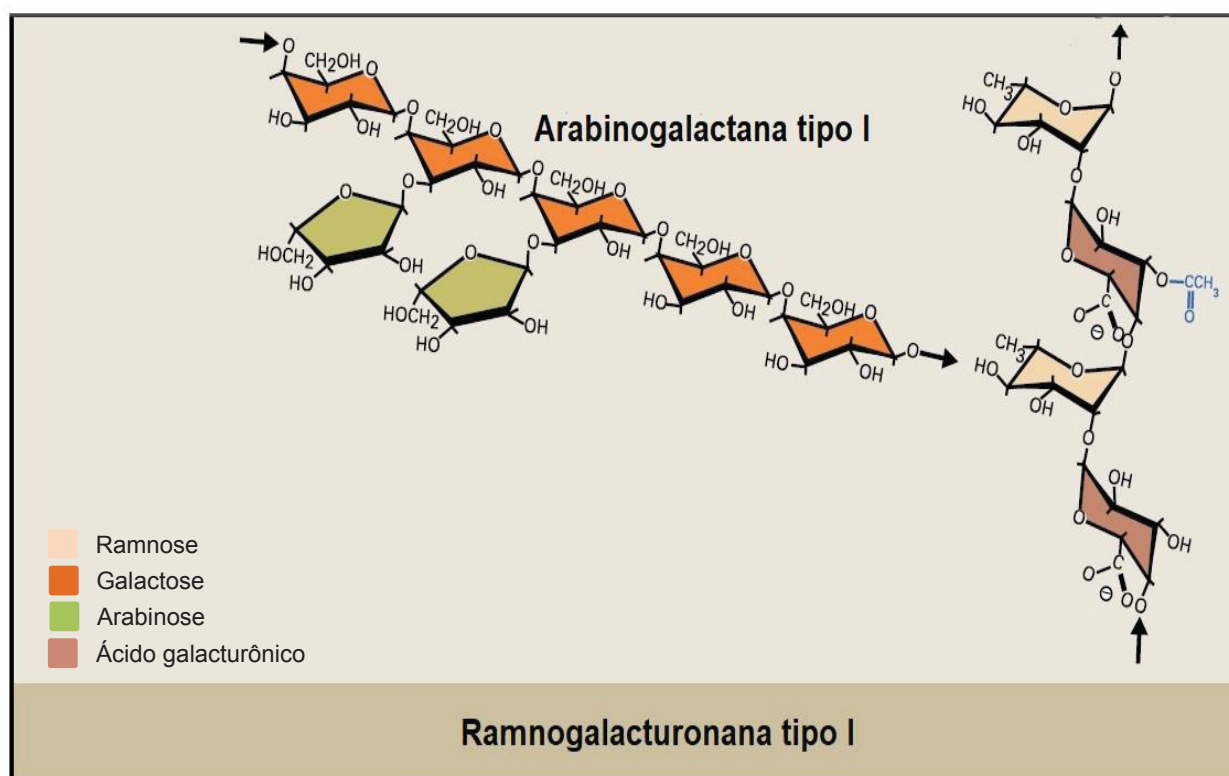


FIGURA 7: ESTRUTURA BÁSICA DE UMA RAMNOGALACTURONANA TIPO I E UMA ARABINO GALACTANA TIPO I (adaptado de CARPITA *et al.*, 2015).

As arabinogalactanas do tipo II (AG-II) representam um grupo de moléculas que possuem cadeias curtas de (1→3)-β-D-galactana e (1→6)-β-D-galactana. As posições O-6 e O-3, quando não são pontos de ramificação das cadeias de galactana, podem apresentar ligação a resíduos de arabinose (FIGURA 8) (FINCHER e STONE, 1983). Podem também apresentar substituições com

monossacarídeos ácidos, como ácido glucurônico, ácido 4-O-metilglucurônico e ácido galacturônico (STEPHEN, 1983). Além disso, as AG-II podem estar em associação com proteínas ricas em hidroxiprolina (AGPs). Esta estrutura, localizada na membrana plasmática, permite reconhecimento celular em estados específicos de desenvolvimento por anticorpos monoclonais (CARPITA *et al.*, 2015).

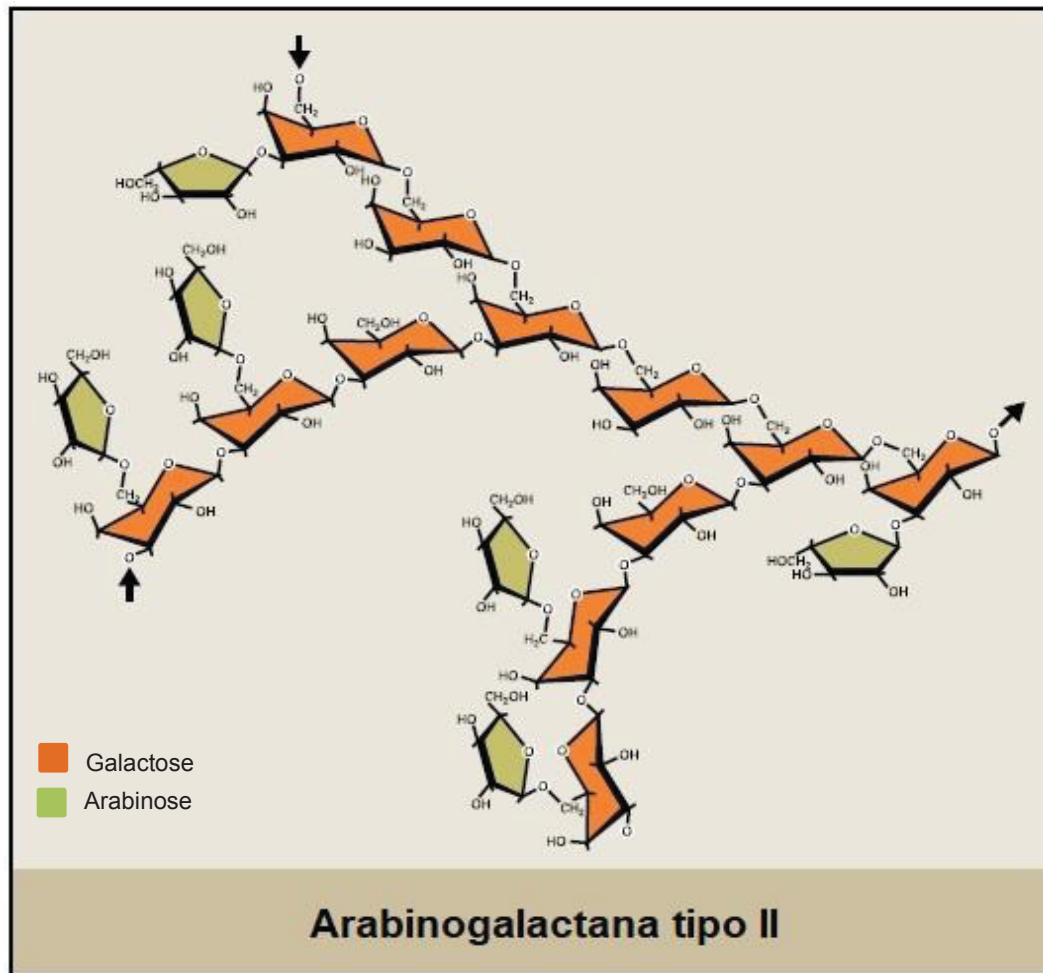


FIGURA 8: ESTRUTURA BÁSICA DE UMA ARABINO GALACTANA TIPO II (adaptado de CARPITA *et al.*, 2015).

2.3.3 HEMICELULOSES

As hemiceluloses são polissacarídeos que estão intimamente organizados com a celulose na estrutura da parede celular. São constituídas de unidades monossacarídicas de D-manose, D-galactose, D-glucose, L-arabinose, D-xilose, ácido D-galacturônico, ácido D-glucurônico e ácido 4-O-metilglucurônico e podem ainda apresentar grupamentos O-acetil ligados às unidades pertencentes às cadeias principal e/ou lateral (ASPINALL, 1959; FENGEL e WEGNER, 1989).

Funcionalmente, as hemiceluloses formam uma película sobre as microfibrilas de celulose, através de ligações de hidrogênio, e as ligam de modo a formar uma rede (CARPITA *et al.*, 2015). As hemiceluloses são representadas pelas xilanas, mananas, glucomananas, galactomananas, xiloglucanas, entre outras estruturas (CAFFALL *et al.*, 2009).

2.3.3.1 XILANAS

As xilanas são os polissacarídeos mais abundantes, depois da celulose, na maioria das angiospermas, localizadas principalmente em suas paredes secundárias (ASPINALL, 1980). Encontram-se fortemente associadas às microfibrilas de celulose na parede através de pontes de hidrogênio (VARNER e LIN, 1989) ou a proteínas da parede secundária (GREGORY *et al.*, 1998).

As xilanas são polímeros formados de resíduos de (1→4)-β-D-Xylp, e podem ocorrer na natureza como arabinoxilana (AX), glucuronoarabinoxilana (GAX), glucuronoxilana (GX) e homoxilana não substituída. Podem, ainda, apresentar grupamentos acetil nas posições O-2 ou O-3 (CAFFALL *et al.*, 2009).

2.4 AÇÕES BIOLÓGICAS DE POLISSACARÍDEOS DE PLANTAS

No consumo do chá feito com plantas, muitos compostos extraídos são ingeridos, entre eles metabólitos primários, incluindo os polissacarídeos (GRANDI *et al.*, 1989; ROERSCH, 2010; KASHANIPOUR *et al.*, 2004; AGRA *et al.*, 2007).

Os polissacarídeos, por apresentarem atividade biológica, representam uma importante classe de compostos bioativos que podem ser utilizados na farmacoterapia de diversas condições clínicas (SIMOES, 2003). A atividade destes polissacarídeos está associada a diversificação de parâmetros estruturais, como a composição monossacarídica, tipo e configuração da ligação glicosídica, tamanho e peso molecular, e presença ou não de ramificação (SRIVASTAVA e KULSHRESHTHA, 1989).

Muitos estudos já demonstram que os polissacarídeos apresentam atividade antioxidante (NERGARD *et al.*, 2005; CHEN e HUANG, 2019), anti-inflamatória (CARBONERO *et al.*, 2008; ANANTHI *et al.*, 2010; OLIVEIRA, *et al.*, 2017; NASCIMENTO *et al.*, 2015; NASCIMENTO *et al.*, 2016; BEZERRA *et al.*, 2018) gastroprotetora (NASCIMENTO *et al.*, 2013; JUNGLES *et al.*, 2014; CIPRIANI *et al.*, 2006), imunomodulatória (CAILLOT *et al.*, 2018), antiviral (CHEN e HUANG, 2018), antitumoral (STIPP *et al.*, 2017), antineoplásica (ADAMI *et al.*, 2018) antidepressiva (WANG *et al.*, 2010), anticoagulante (BARDDAL *et al.*, 2015; ROMÁN *et al.*, 2017), antinociceptiva (NASCIMENTO *et al.*, 2013; LEIVAS *et al.*, 2016; NASCIMENTO *et al.*, 2015), entre outras.

2.5 INFLAMAÇÃO

A inflamação é uma resposta protetora natural que tem por objetivo final iniciar um processo de reparo. Isto é feito através da destruição ou neutralização de agentes nocivos e tóxicos. As células envolvidas neste processo compreendem as células de defesa, como os leucócitos e proteínas plasmáticas, células residentes das paredes vasculares e proteínas da matriz extracelular. A inflamação pode ser de dois tipos: aguda ou crônica. Os sinais cardinais da inflamação são conhecidos como rubor, calor, edema, dor e a perda de função (KUMAR *et al.*, 2013).

A inflamação aguda caracteriza-se por apresentar resposta rápida e de curta duração. Neste processo, ocorre exsudação de líquido e de proteínas plasmáticas e acúmulo de leucócitos. Já a inflamação crônica tem maior duração e caracteriza-se pelo influxo de macrófagos e linfócitos, e fibrose (processo de cicatrização). Na inflamação aguda, ocorrem alterações vasculares, aumentando o fluxo sanguíneo, responsável pela vermelhidão e calor observados, e aumento da permeabilidade vascular, permitindo que as proteínas plasmáticas deixem a circulação em direção ao sítio de inflamação. As células endoteliais são ativadas, aumentando a adesão e migração dos leucócitos nas paredes dos vasos. Os principais leucócitos nesta fase são os neutrófilos. O acúmulo do exsudato, rico em proteínas plasmáticas, aumenta a pressão osmótica, e é a causa do edema verificado na reação inflamatória, com a finalidade de diluir o agente nocivo (KUMAR *et al.*, 2013).

Resumidamente, quando ocorre um estímulo pró-inflamatório, provocado pela lesão de tecido ou infecção, células como macrófagos, células dendríticas,

mastócitos e outras percebem a alteração. Como consequência, secretam moléculas pró-inflamatórias como as citocinas e outros mediadores, que por sua vez irão induzir a resposta inflamatória. Em seguida, ocorre recrutamento de leucócitos até o local lesionado. Os leucócitos, agora ativados, tentam fagocitar o agente nocivo, na tentativa de eliminá-lo. O processo inflamatório é regulado: uma vez que as células e mediadores cumprem com a eliminação do agente lesivo, elas são inativadas ou degradadas (FIGURA 9) (KUMAR *et al.*, 2013).

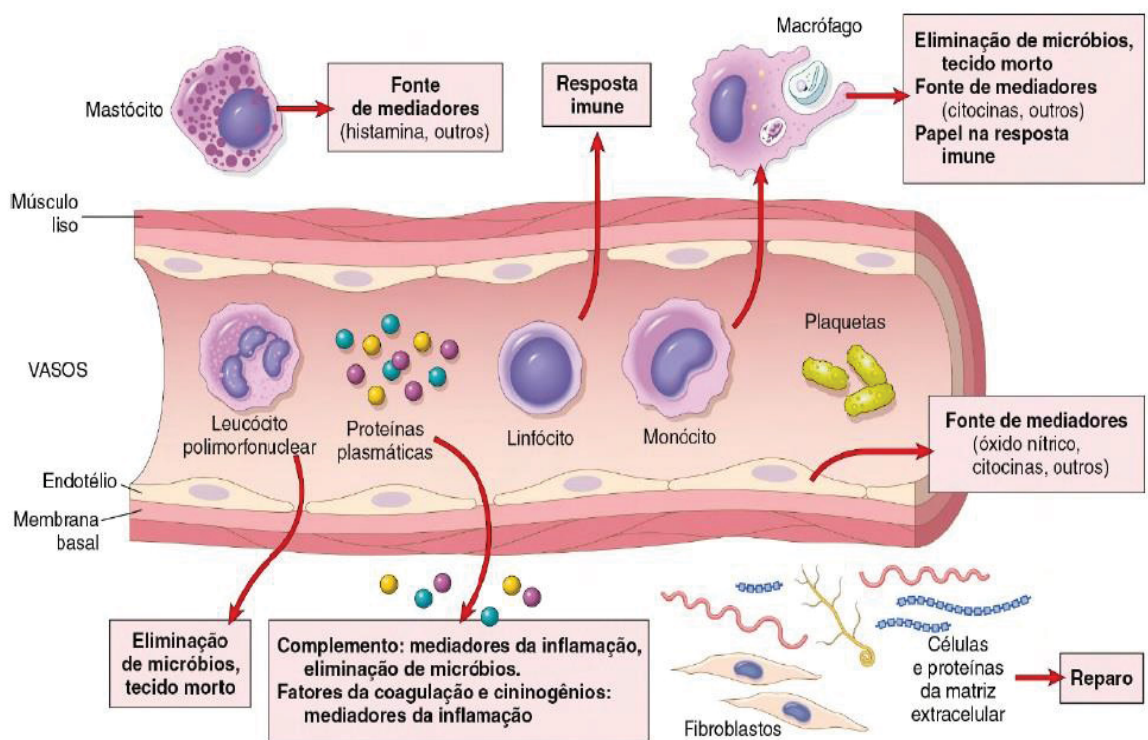


FIGURA 9: ESQUEMA DO PROCESSO INFLAMATÓRIO AGUDO, SEUS COMPONENTES E FUNÇÕES (KUMAR *et al.*, 2013).

A dor, um dos sinais cardinais da inflamação, se manifesta por diversos mecanismos diferentes. Alguns desses mecanismos são intrínsecos a uma condição dolorosa. Outros podem estar presentes concomitantemente em doenças, ou serem expressos em momentos diferentes ao longo da história clínica da doença. Ou até mesmo, um mesmo sintoma de dor pode ser provocado por mais de um mecanismo (SCHOLZ e WOOLF, 2002). Em experimentos biológicos, é possível mensurar o componente fisiológico da dor, a nocicepção.

A nociceção é um mecanismo sensorial essencial para sobrevivência, permitindo a sensação e impedimento de potenciais danos de tecidos, frente a estímulos nocivos (TRACEY, 2017). A nociceção se dá através da detecção e resposta de formas danosas no ambiente como calor, estresse mecânico e químico, pelos nociceptores (TRACEY, 2017; SCHOLZ e WOOLF, 2002).

Os nociceptores, por meio de transdução sensorial, convertem o estímulo nocivo em corrente iônica na forma de potencial de ação, o qual é carregado por fibras nervosas, permitindo a transmissão de sinal até o sistema nervoso central (TRACEY, 2017). Os nociceptores são fibras que medeiam a dor e inervam densamente os tecidos periféricos (PINHO-RIBEIRO, 2017). As fibras variam de acordo com o calibre do axônio, grau de mielinização e propriedades de condução. As fibras A δ possuem diâmetro médio, são pouco mielinizadas, apresentam velocidade de condução alta, e respondem a estímulos químicos, mecânicos e/ou térmicos (TRACEY, 2017). As fibras C possuem diâmetro inferior, não são mielinizadas, possuem velocidade de condução lenta, e são, na maioria, polimodais, o que significa que uma fibra responde a diferentes estímulos (químicos, térmicos, mecânicos) (DUBIN e PATAPOUTIAN, 2010; JULIUS, 2001). Ambas apresentam elevado limiar de ativação e terminações livres na periferia. Os axônios dos nociceptores conectam-se aos circuitos nervosos no corno dorsal da medula espinhal, nas lâminas I e II, as quais transmitem o sinal para o encéfalo. Quando o estímulo periférico chega ao cérebro, a sensação dolorosa depende do tipo de neurônio que foi ativado previamente (TRACEY, 2017). Os terminais dos nociceptores expressam receptores em sua superfície, canais estimulados por ligantes ou íons – TRPV₁, TRPA₁, Nav1.7, Nav1.8, entre outros –, e atuam como transdutores moleculares dos estímulos nocivos (FIGURA 10). Os leucócitos liberam mediadores pró-inflamatórios que modulam a atividade dos nociceptores, alterando o seu limiar de ativação, e consequentemente modificando sua sensibilidade à dor (PINHO-RIBEIRO, 2017).

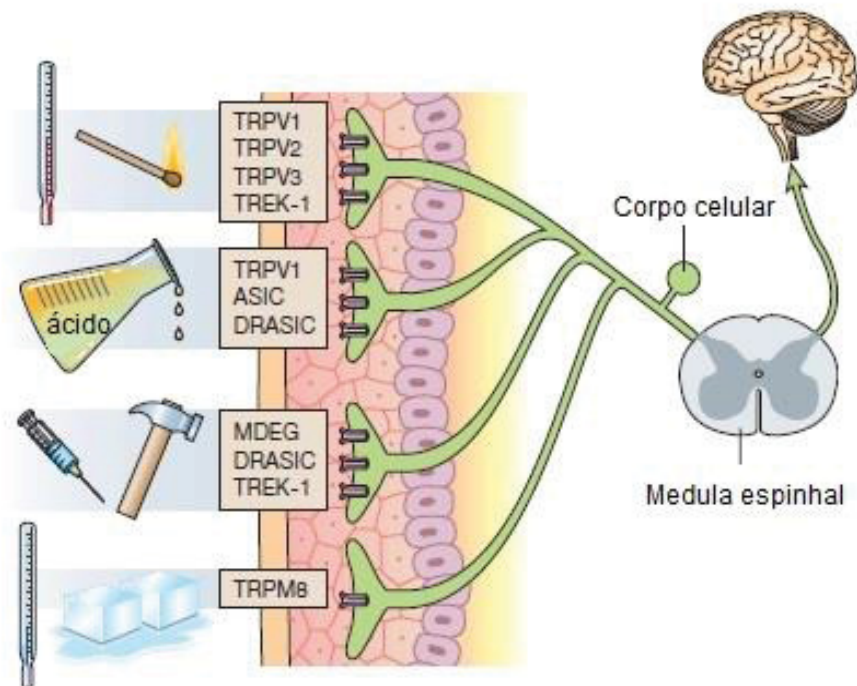


FIGURA 10: NOCICEPÇÃO (adaptado de SCHOLZ e WOOLF, 2002).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Extrair, fracionar e caracterizar estruturalmente polissacarídeos das folhas de *Piper umbellatum* e *Piper regnellii* e avaliar a contribuição dos polissacarídeos de *P. umbellatum* na atividade anti-inflamatória popularmente conhecida do chá da planta.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Extrair os polissacarídeos de *P. umbellatum* por extração aquosa a quente, purificá-los e caracterizá-los estruturalmente;
- Extrair polissacarídeos de *P. regnellii* por extração aquosa a quente (decocto), purificá-los e caracterizá-los estruturalmente;
- Avaliar a contribuição dos polissacarídeos isolados das folhas de *P. umbellatum* na atividade anti-inflamatória do chá, pelo modelo da indução de nocicepção pelo ácido acético em camundongos.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS BOTÂNICOS

As folhas de *P. regnellii* foram coletadas em Curitiba (PR), no bairro Barreirinha e as folhas de *P. umbellatum* foram coletadas em Petrópolis (RJ). Ambas as plantas foram identificadas pela Prof. Dr. Élide Pereira dos Santos, do Departamento de Botânica da UFPR. Os exemplares de *P. regnellii* estão depositados no Herbário do Departamento de Botânica sob os números de registro 93003 e 93004 e os de *P. umbellatum* sob o número de tombamento 93002 e 93005. Após a coleta, as folhas foram submetidas à secagem por liofilização.

4.2 EXTRAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS

As folhas secas (147 g de folhas de *P. umbellatum* e 65 g de folhas de *P. regnellii*) foram submetidas à extração aquosa a quente (100 °C) por decocção, em uma proporção 1:10 (p/v) de folhas:água destilada. Após fervura por 15 minutos, o extrato foi resfriado e filtrado por algodão. O processo foi repetido três vezes em sequência com as mesmas folhas, com a finalidade de aumentar o rendimento da extração.

Os extratos aquosos resultantes foram concentrados em rotaevaporador até pequeno volume (aproximadamente 300 mL) e tratados com etanol absoluto gelado (3 volumes), para precipitação dos polissacarídeos. O precipitado foi separado do sobrenadante por centrifugação (8000 rpm por 15 minutos) e o sobrenadante etanólico foi concentrado por rotarvaporação e liofilizado. O material precipitado foi dialisado em membranas com limite de exclusão de 6-8 kDa e liofilizado.

4.3 PURIFICAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS

4.3.1 FRACIONAMENTO DOS POLISSACARÍDEOS POR CONGELAMENTO E DEGELO

Uma vez solubilizado em água destilada (10% p/v), o precipitado etanólico foi submetido ao fracionamento por congelamento e degelo, o qual consistiu no congelamento do extrato com posterior descongelamento a temperatura ambiente. As frações precipitadas (PUPGD e PRPGD), insolúveis em água fria, foram separadas do sobrenadante (PUSGD e PRSGD) por centrifugação (8000 rpm, 15 minutos, 25 °C). O procedimento foi repetido até que não fosse observado mais precipitado a partir da fração sobrenadante. As duas frações, solúvel e insolúvel em água fria, foram liofilizadas.

4.3.2 FRACIONAMENTO DOS POLISSACARÍDEOS POR ULTRAFILTRAÇÃO

Foram utilizadas membranas de polietersulfona (Sartorius) com diferentes limites de exclusão (30, 100 e 300 kDa) para o fracionamento dos polissacarídeos. As amostras fracionadas por este processo foram solubilizadas em água destilada em uma concentração de 10% (p/v). A fração PUSGD foi submetida à ultrafiltração utilizando membrana de 100 kDa, gerando as frações PU100R (retida) e PU100E (eluída). A fração PU100E foi ultrafiltrada com limite de exclusão de 30 kDa, originando as frações PU30E e PU30R. A fração PU100R foi submetida a uma nova ultrafiltração com membrana de 300 kDa, separando-se nas frações PU300E e PU300R.

A fração PRSGD foi ultrafiltrada utilizando membrana de 30 kDa. As frações eluída (PR30E) e retida (PR30R) foram obtidas nesta etapa.

4.3.3 FRACIONAMENTO DOS POLISSACARÍDEOS POR DIÁLISE

As frações PU300R e PU300E foram solubilizadas em água destilada e dialisadas em membrana de 500 kDa e 12-14 kDa, respectivamente, gerando as frações retidas nas membranas PU500R e PU12. Sequencialmente, as frações foram congeladas e liofilizadas.

4.3.4 FRACIONAMENTO DOS POLISSACARÍDEOS POR SOLUBILIDADE

A fração PU500R foi dividida em PU500w e PU500d conforme a variação de solubilidade apresentada na preparação da amostra PU500R para análise de RMN. A fração foi solubilizada em água deuterada, gerando a fração PU500w, e em seguida, PU500R foi solubilizada em DMSO, originando PU500d.

4.4 ANÁLISE ESTRUTURAL DE POLISSACARÍDEOS

4.4.1 COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA

4.4.1.1 HIDRÓLISE DOS POLISSACARÍDEOS

A análise de composição monossacarídica foi realizada para todas as frações obtidas a partir do extrato aquoso de ambas as plantas. Aproximadamente 2 mg das frações previamente liofilizadas foram hidrolisadas com adição de 1 mL de ácido trifluoroacético (TFA) 2 M, em estufa a 100 °C, por um período de 8 horas. O material hidrolisado foi evaporado à secura e o resíduo resultante foi ressolubilizado com 1 mL de água destilada. Parte dessa solução foi destinada à análise cromatográfica em camada delgada (TLC).

4.4.1.2 REDUÇÃO DOS MONOSSACARÍDEOS A ALDITOIS

Os monossacarídeos obtidos pela etapa anterior foram reduzidos a alditóis com acréscimo de NaBH₄ até pH 9,0. A reação se estendeu por 18 horas à temperatura ambiente e foi interrompida com adição de ácido acético até que o pH alcançasse a neutralidade. Em seguida, o material reduzido foi congelado e liofilizado. O ácido bórico resultante da redução foi retirado como borato de trimetila por consecutivas adições de metanol e evaporação em rotaevaporador (WOLFROM e THOMPSON, 1963).

4.4.1.3 ACETILAÇÃO DOS ALDITOIS

Os alditóis foram acetilados utilizando uma mistura de piridina:anidrido acético (1:1 v/v; 1 mL) à temperatura ambiente por 16 horas. Após esse período, a reação foi descontinuada com adição de 1 mL de água destilada. Os acetatos de alditóis provenientes da acetilação foram extraídos com clorofórmio, e subsequentemente lavados com solução aquosa de CuSO_4 5%, com a finalidade de remover a piridina residual. O excesso de solução sulfato CuSO_4 foi removido com a adição de sulfato de sódio anidro. O material foi filtrado através de algodão e os acetatos de alditóis foram analisados por GC-MS ou GLC.

4.5 METILAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS

As frações PU500R, PU30E, PR30R e PR30E foram metiladas conforme o método descrito por CIUCANU e KERÉK (1984). Cada fração polissacarídica (5 mg) foi individualmente solubilizada em 500 μL de dimetilsulfóxido (DMSO). Aproximadamente 200 mg de hidróxido de sódio triturado foram adicionados à solução, de modo a observar saturação da solução. Em seguida, 500 μL de iodometano (CH_3I) foram adicionados como agente metilante seguido de agitação em vórtex por 30 minutos e após, repouso por 24 horas. A metilação foi interrompida com 1 mL de água destilada e a solução foi acidificada até pH 1,0 com HCl diluído. O polissacarídeo metilado foi extraído com clorofórmio e submetido a repetidas lavagens com água destilada. A fração clorofórmica contendo o polissacarídeo metilado foi evaporada à securo e para a hidrólise, o material foi ressuspenso em 250 μL de H_2SO_4 (72% v/v), mantido em gelo por 1 h, seguido de adição de 2 mL de água destilada, e levado a 100 °C por 16 horas. Em seguida, o material hidrolisado foi neutralizado com BaCO_3 até pH 7,0 e foi submetido a centrifugação por 10 minutos a 10 °C a 10000 rpm. O material hidrolisado foi reduzido e acetilado conforme os itens 4.4.1.2 e 4.4.1.3, com a diferença de ter sido reduzido com NaBD_4 . Os acetatos de alditóis parcialmente metilados foram analisados por GC-MS e identificados pelos seus perfis de fragmentação e tempos de retenção (SASSAKI *et al.*, 2005).

4.6 MÉTODOS ANALÍTICOS

4.6.1 TESTE DE HOMOGENEIDADE E DETERMINAÇÃO DA MASSA MOLECULAR

A determinação do perfil de homogeneidade das amostras foi realizada por cromatografia de exclusão estérica de alta performance (HPSEC – *high performance size exclusion chromatography*). As amostras de frações polissacarídicas foram solubilizadas com uma solução de nitrito de sódio 0,1 M e azida 0,2 g/L para uma concentração final de 1 mg/mL. As amostras solubilizadas foram filtradas utilizando membranas de acetato de celulose com porosidade de 0,22 μm . O volume de injeção de amostra no equipamento foi de 100 μL . A mesma solução utilizada na solubilização das amostras foi utilizada como eluente, com um fluxo controlado de 0,6 mL/min. Todas as análises de homogeneidade foram executadas no equipamento da *Wyatt Technology*, acoplado a um cromatógrafo de exclusão estérica de alta performance. O aparelho dispõe de quatro colunas de gel permeação em série, com limites de exclusão 7×10^6 , 4×10^5 , 8×10^4 e 5×10^3 . A detecção do perfil de homogeneidade foi realizada através dos detectores de índice de refração (RID-*refractive index detector*) e ultravioleta a 280 nm e espalhamento de luz laser multiângulos. Os cromatogramas foram analisados através do *software* ASTRA.

A massa molar da fração PR30R foi determinada através da taxa de variação do índice de refração com relação à variação de concentração (dn/dc). A amostra foi solubilizada em nitrito de sódio 0,1 M e azida 0,2 g/L para uma concentração de 1 mg/mL e filtrada utilizando filtros de membrana de acetato de celulose com porosidade de 0,22 μm . A partir desta solução, foram feitas diluições para as concentrações finais de 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 e 1,0 mg/mL. Estas diluições de PR30R foram analisadas pelo detector de índice de refração, com as colunas desacopladas. O fluxo de solvente foi de 0,1 mL/min e o resultado obtido foi analisado com o *software* ASTRA.

4.6.2 CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (TLC)

As frações PUSGD e PRSGD tiveram seus polissacarídeos hidrolisados com TFA a 100°C e foram analisadas por cromatografia em camada delgada para a identificação de ácidos urônicos.

Para o procedimento, foram utilizadas placas de sílica gel 60G (Merck) com 10 cm de altura total. A fase móvel foi constituída de uma mistura de acetato de etila:1-propanol:ácido acético:água em uma proporção de 4:2:2:1 (v/v). O revelador empregado na análise foi orcinol-ácido sulfúrico, a 100 °C (SKIPSKI, 1975).

4.6.3 GC-MS

A cromatografia líquido-gasosa acoplada à espectrometria de massas foi realizada em cromatógrafo Varian Saturn 2000R – 3800, acoplado a um espectrômetro de massa Varian Ion-Trap 2000R, utilizando a coluna capilar de sílica fundida DB-225 (30 m x 0,25 mm) e hélio ultrapuro, a um fluxo de 1 mL/min, como gás de arraste. Os acetatos de alditóis foram analisados a uma temperatura de 50 – 220°C (40 °C/min) e os acetatos de alditóis parcialmente metilados foram analisados a uma temperatura de 50 – 215°C (40 °C/min).

4.6.4 RMN

As análises de RMN foram realizadas em espectrômetro Bruker-Avance III (400 MHz) ou Bruker 600 MHz. As frações foram analisadas à temperatura de 50 °C 70°C ou , em D₂O ou DMSO deuterado. Os espectros foram calibrados com referência interna, variando de acordo com cada fração (acetona a 30,2/2,22 ou DMSO a 39,7/2,39 ppm para ¹³C/¹H). As amostras foram submetidas à análise por experimentos unidimensionais de ¹³C, ¹H e DEPT-135 e bidimensionais homo e heteronucleares, como COSY, TOCSY, e HSQC.

4.6.5 DOSAGEM DE ÁCIDOS URÔNICOS

A dosagem de açúcares ácidos ou ácidos urônicos foi executada conforme metodologia descrita por Filisetti-Cozzi e Carpita (1991), a qual consiste em um ensaio colorimétrico. A 400 µL de amostra (0,15 mg/mL) foram adicionados 40 µL de uma solução de ácido sulfâmico-sulfamato de potássio 4 M (pH 1,6) e 2,4 mL de solução de tetraborato de sódio (75 mmol/L em H₂SO₄), seguido de homogeneização em vórtex. Após a adição de todos os reagentes, a solução foi aquecida em banho-maria fervente por 20 minutos, seguida de resfriamento em banho de gelo. Foram então adicionados 80 µL de m-hidroxibifenila (0,15% p/v em NaOH 0,5% p/v). Após agitação em vórtex, foi observado o aparecimento da coloração rosa. Os conteúdos dos tubos-teste foram transferidos para placas de ELISA e sua coloração foi lida em espectrômetro leitor de placa em 525 nm. A análise quantitativa dos resultados foi feita em função da construção de uma curva padrão de ácido galacturônico, respeitando a sensibilidade do método.

4.6.6 DETERMINAÇÃO DE AÇÚCARES TOTAIS

A determinação de açúcares totais foi feita conforme o método de Dubois *et al.*, (1956). As frações testadas foram solubilizadas em água destilada em uma concentração de 70 µg/mL. A essa solução, foram adicionados 0,5 mL de fenol 5% e 2,5 mL de ácido sulfúrico concentrado. Após agitação em vórtex, a solução foi deixada em repouso por 20 minutos. A presença de açúcares totais foi evidenciada pela formação de coloração alaranjada. 200 µL foram pipetados e transferidos para uma placa de ELISA e o resultado foi lido em espectrômetro de leitor de placa em 490 nm. A análise quantitativa se deu através de curva padrão dos monossacarídeos Ara, Gal, GalA e Glc (1:1:1:1 p/p), em uma concentração de 1 mg/mL.

4.7 TESTES DE ATIVIDADE BIOLÓGICA ANTI-INFLAMATÓRIA

4.7.1 ANIMAIS

Foram utilizados nos testes de atividade biológica camundongos *Mus musculus* fêmeas variedade Swiss com peso entre 25-30 g. Os animais foram acondicionados em sala com temperatura controlada (22 ± 2 °C), exaustão de ar, ciclo claro/escuro de 12 h e acesso livre a ração (Nuvilab cr-1 Quimtia S/A) e água. Os animais foram fornecidos pelo Biotério do Setor de Ciências Biológicas da UFPR e os protocolos experimentais foram previamente aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFPR (CEUA/BIO-UFPR), sob o protocolo número 1178.

4.7.2 AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTINOCICEPTIVO DA ADMINISTRAÇÃO INTRAPERITONEAL DE PUSGD E PU500R NO MODELO DE CONTORÇÕES ABDOMINAIS INDUZIDAS PELA INJEÇÃO DE ÁCIDO ACÉTICO

No dia anterior ao experimento, os animais foram anestesiados com halotano embebido em chumaço de algodão. Foi administrado intravenosamente solução de azul de Evans 2,5% (10 mL/kg), usado como marcador da permeabilidade capilar peritoneal. No dia do experimento, os animais foram pré-tratados intraperitonealmente (i.p.) com veículo (salina estéril, 0,9%), dexametasona (1 mg/kg, i.p.), PUSGD (0,1; 1,0; 3,0 mg/kg, i.p.) ou PU500R (0,402 mg/kg i.p.) 30 minutos antes da injeção intraperitoneal de ácido acético 0,6 % (0,45 mL/camundongo). Os animais foram colocados individualmente sob funis de vidro para análise do comportamento nociceptivo, sendo que o número de contorções abdominais foram contabilizadas cumulativamente durante 20 min. Após, os animais foram eutanasiados e tiveram sua cavidade peritoneal lavada com 1 mL de salina com heparina (25 IU/mL). O total de células encontradas no peritônio foram contadas utilizando câmara de Neubauer e a permeabilidade vascular peritoneal analisada em espectrofotômetro de leitor de placa a 620 nm, interpolando os valores com uma curva padrão de azul de Evans (1 a 1000 µg/mL). A dose de PU500R foi calculada com base no rendimento da fração em relação a PUSGD (13,04%) e utilizando a dose efetiva nos parâmetros avaliados testando PUSGD, de 3 mg/kg.

4.7.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados estão apresentados como média \pm erro padrão das médias e foram avaliados através da análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida do

teste para múltiplas comparações de Bonferroni. A diferença significativa entre os grupos foi considerada quando $*p < 0,05$. Todas as análises foram realizadas pelo programa estatístico GraphPad Prism 6®, versão 6.01, da GraphPad Software, USA.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 RESULTADOS DE *P. umbellatum*

5.1.1 EXTRAÇÃO E FRACIONAMENTO DOS POLISSACARÍDEOS

As folhas liofilizadas e trituradas de *P. umbellatum* foram submetidas à extração aquosa a quente por decocção, em uma proporção de 1:10 (p/v), e o extrato resultante foi fracionado por diversas etapas de purificação. O fluxograma esquematizado abaixo (FIGURA 11) demonstra resumidamente os passos adotados para purificação das frações.

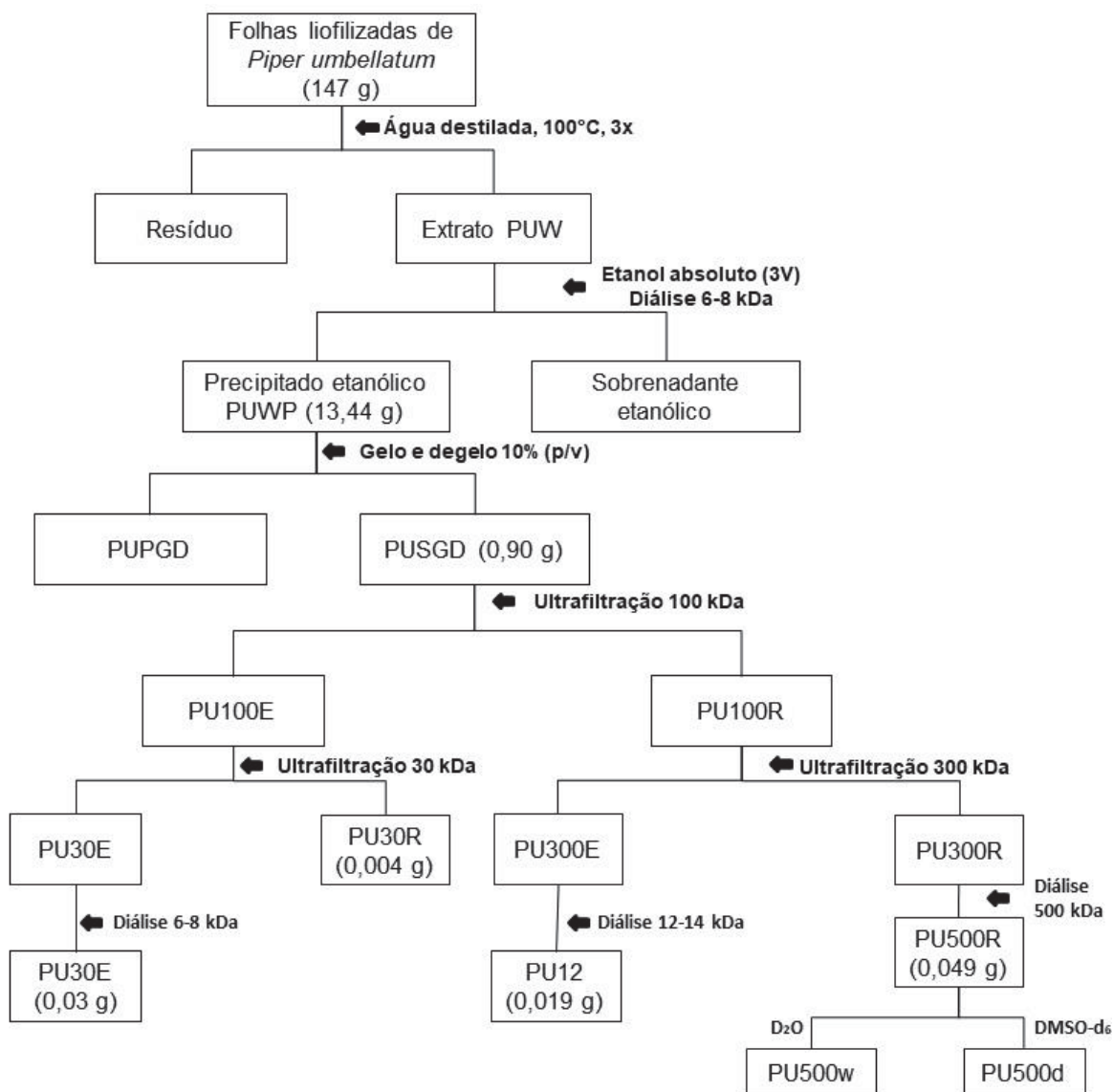


Figura 11: FLUXOGRAMA DO PROCEDIMENTO DE EXTRAÇÃO AQUOSA E PURIFICAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS DE *P. umbellatum*.

Com uso de etanol absoluto gelado os componentes de alta massa foram separados dos de baixa massa molecular, gerando um precipitado (PUWP) contendo a fração polissacarídica que em seguida foi dialisado em membrana de 6-8 kDa e liofilizado.

Iniciamente, foi realizado o congelamento e degelo de PUWP, separando as frações solúvel e insolúvel em água fria (PUSGD e PUPGD, respectivamente). A fração solúvel foi analisada quanto ao seu perfil de eluição por cromatografia de exclusão estérica de alta performance, atestando perfil heterogêneo, que pode ser visualizado na FIGURA 12.

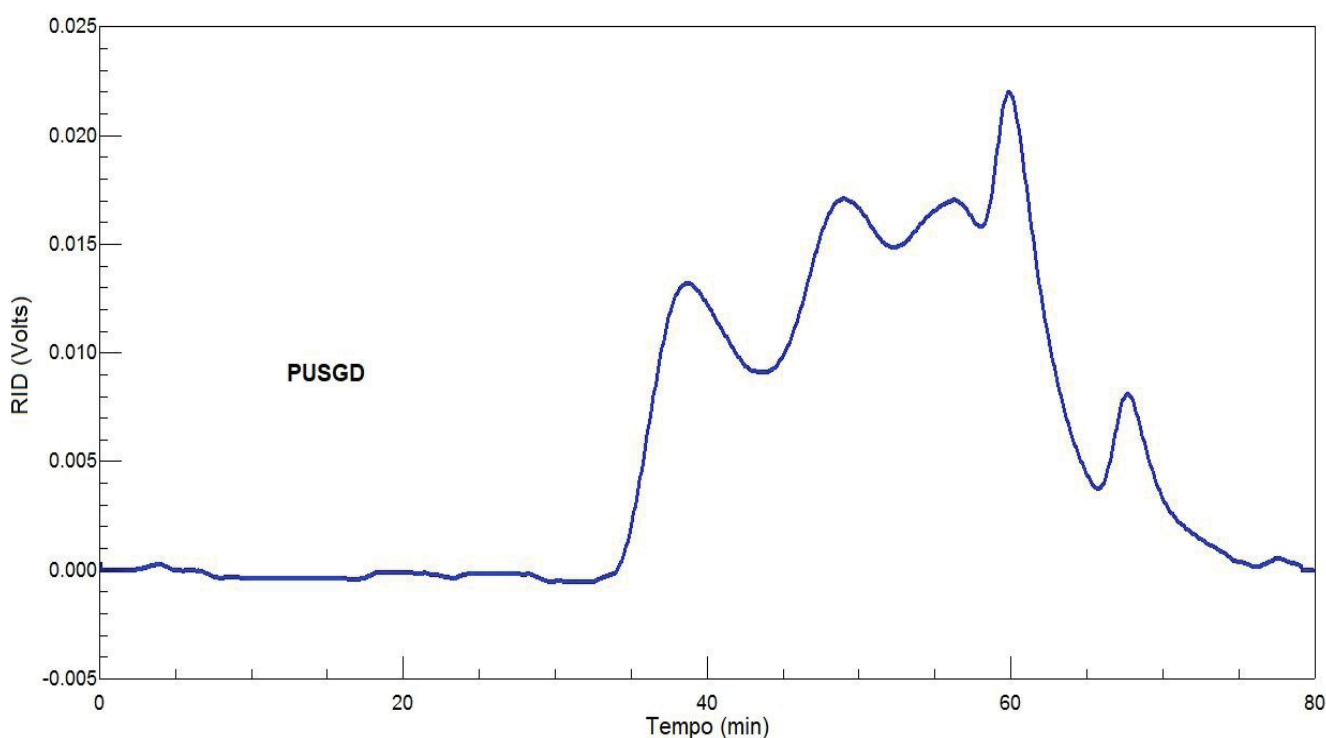


FIGURA 12: PERFIL DE ELUIÇÃO EM HPSEC UTILIZANDO DETECTOR DE ÍNDICE DE REFRAÇÃO (RID) DA FRAÇÃO PUSGD.

A fração PUSGD foi fracionada por ultrafiltração utilizando membrana com limite de exclusão de 100 kDa, originando duas novas frações: PU100E (eluída) e PU100R (retida). Com a finalidade de verificar a separação das moléculas, foi realizada uma nova análise das frações resultantes por HPSEC. Uma vez verificado o perfil heterogêneo para ambas as frações, as estratégias adotadas foram novas

ultrafiltrações utilizando membrana de 30 kDa para a fração PU100E e de 300 kDa para a fração PU100R. As frações resultantes dos processos, PU30R (retida em membrana de 30 kDa), PU30E (eluída em membrana de 30 kDa), PU300R (retida em membrana de 300 kDa) e PU300E (eluída em membrana de 300 kDa), foram analisadas em relação ao seu perfil de eluição em HPSEC. Todas as frações apresentaram perfil heterogêneo de eluição (FIGURA 13). A fração PU30E foi sequencialmente dialisada em membrana de 6-8 kDa. A fração PU30R apresentou rendimento muito baixo (4,6 mg) e não foi analisada.

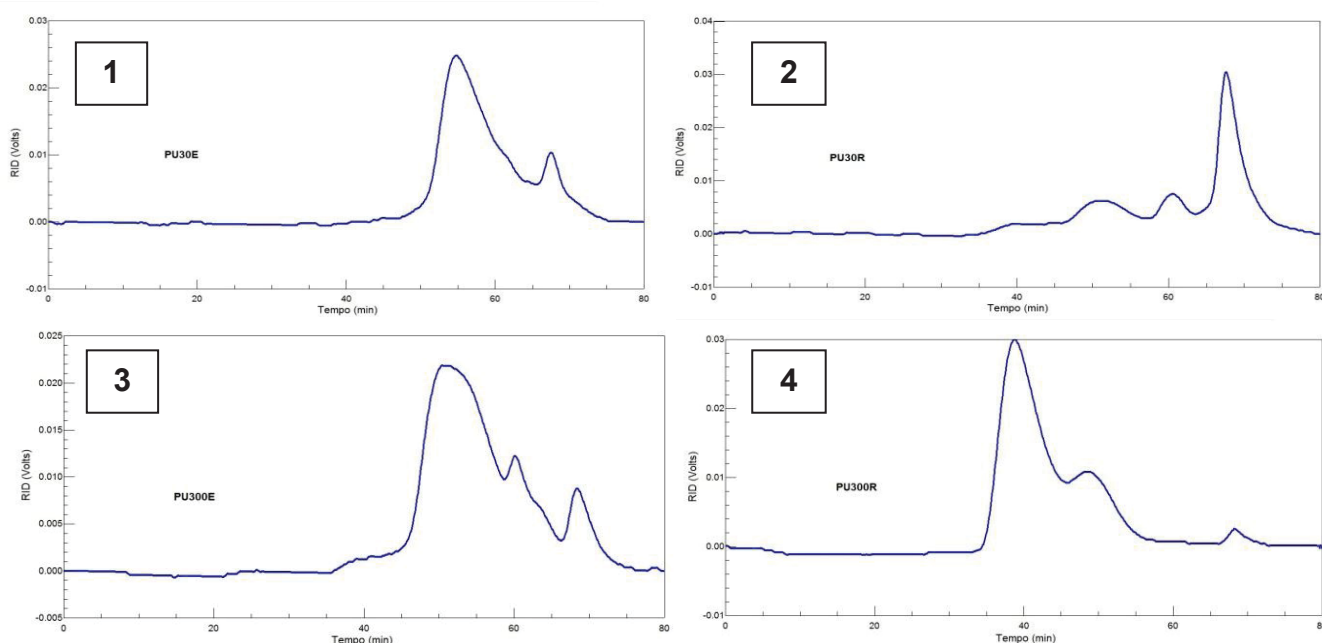


FIGURA 13: PERFIS DE ELUIÇÃO EM HPSEC UTILIZANDO DETECTOR DE ÍNDICE DE REFRAÇÃO (RID) DAS FRAÇÕES PU30E (1), PU30R (2), PU300E (3) e PU300R (4).

Também, foi realizado fracionamento por diálise. Os limites de exclusão foram escolhidos conforme os perfis observados nos cromatogramas de HPSEC. Para PU300R, membrana de 500 kDa e para PU300E, de 12-14 kDa, sendo que a fração retida resultante da diálise de PU300E e a fração eluída resultante da diálise de PU300R apresentaram rendimentos ínfimos, e por este motivo não foram analisadas. Uma nova análise por HPSEC foi realizada para a fração PU500R (retida), e o perfil de eluição é evidenciado no cromatograma a seguir (FIGURA 14).

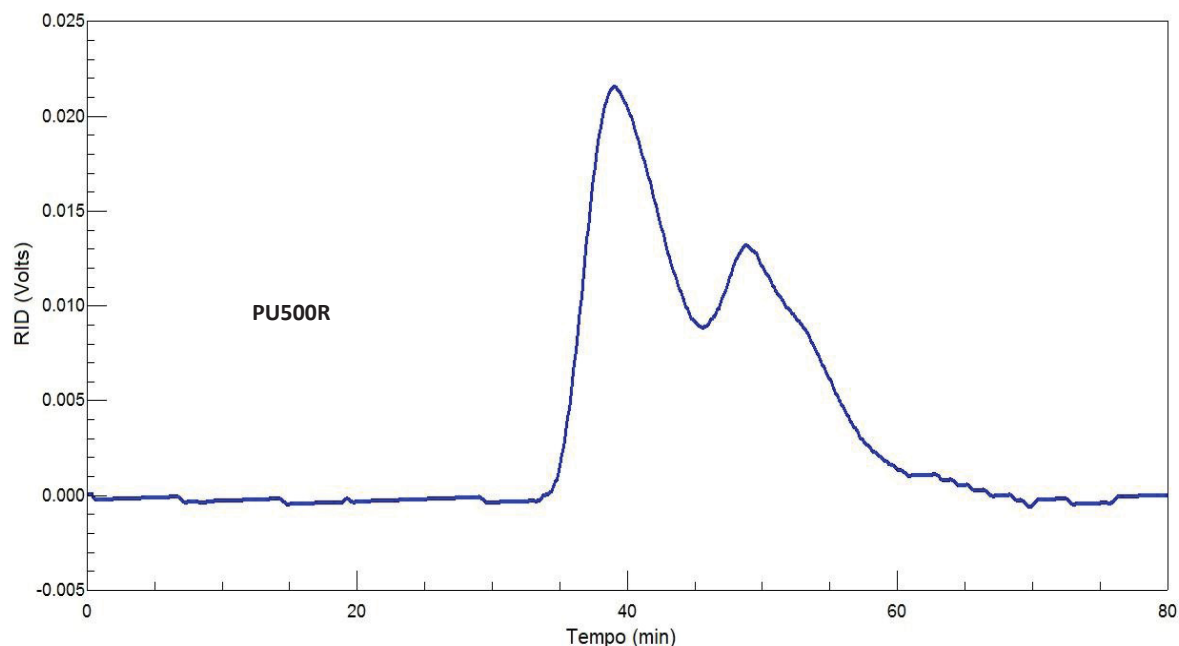


FIGURA 14: PEFIL DE ELUIÇÃO POR HPSEC UTILIZANDO DETECTOR DE ÍNDICE DE REFRAÇÃO DA FRAÇÃO PU500R.

Finalmente, baseando-se nas informações obtidas acerca das frações polissacarídicas nas análises de composição monossacarídica (apresentadas à frente) e nas características químicas geralmente observadas para as moléculas obtidas de plantas, foi possível verificar a presença de dois polissacarídeos distintos da fração PU500R, os quais foram separados de acordo com suas propriedades de solubilidade: a fração PU500w, solúvel em água, e a fração PU500d, solúvel em solvente menos polar, como o DMSO.

Os rendimentos das frações obtidas a partir da extração aquosa de 147 g de folhas liofilizadas podem ser vistos na TABELA 1 a seguir. Houve perda de material em todas as etapas de fracionamento.

TABELA 1 – RENDIMENTO DAS FRAÇÕES ORIGINADAS A PARTIR DA EXTRAÇÃO AQUOSA DAS FOLHAS DE *P. umbellatum*.

Fração	Rendimento	
	(g)	(%)
PUWP	13,44	9,11
PUSGD	0,90	0,61
PUPGD	1,61	1,09
PU30E	0,03	0,02
PU12	0,019	0,01
PU500R	0,049	0,03

Notas: Rendimento calculado a partir de 147 g de folhas secas.

5.2.2 CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DOS POLISSACARÍDEOS

5.2.2.1 COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA E TLC

Todas as frações obtidas ao longo do processo de fracionamento foram analisadas quanto à sua composição monossacarídica. Os açúcares neutros foram quantificados por GC-MS, nas suas formas derivadas de alditóis acetato, e os açúcares ácidos, através do método de Filisetti-Cozzi e Carpita (1991). Com a finalidade de verificar qualitativamente quais unidades monossacarídicas estavam presentes após a hidrólise da fração PUSGD, e para verificar qual o tipo de ácido urônico presente, foi realizada uma TLC utilizando GlcA e GalA como padrões. O resultado obtido na cromatografia e as composições monossacarídicas de cada fração estão mostrados na FIGURA 15 e na TABELA 2, respectivamente.

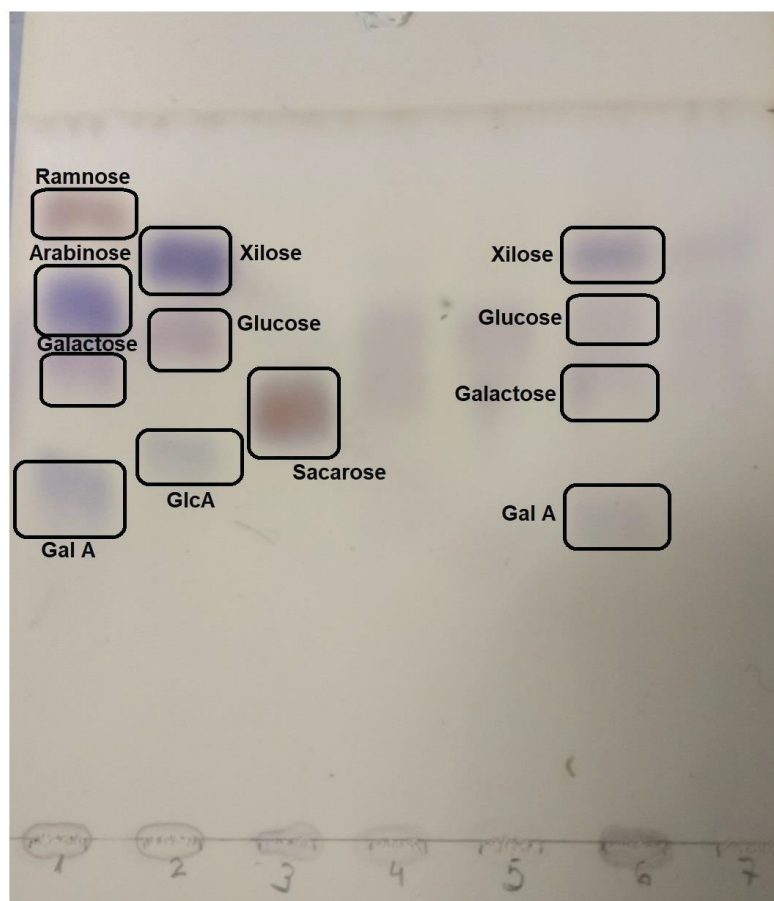


FIGURA 15: TLC DA AMOSTRA PUSGD HIDROLISADA (TFA 2 M, 8 h a 100 °C).

NOTA: A banda 1 refere-se aos padrões de ramnose, arabinose, galactose e GalA. A banda 2, aos padrões de xilose, glucose e ácido glucurônico. A banda 3, ao padrão de sacarose. A banda 6, à fração PUSGD hidrolisada. Fase móvel: ácido acético:1-propanol:acetato de etila:água (4:2:2:1). Revelador: orcinol-ácido sulfúrico a 100°C.

De acordo com a TLC, foi possível concluir que o monossacarídeo ácido presente na fração PUSGD e consequentemente nas frações obtidas pelo fracionamento de PUSGD, é o GalA. Além disso, foi possível identificar que os monossacarídeos neutros de maior teor na fração são glucose, galactose e xilose.

TABELA 2 – COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES DERIVADAS DA EXTRAÇÃO AQUOSA DAS FOLHAS DE *P. umbellatum*

Fração	Monossacarídeos (%)							
	Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc	GalA ¹
PUWP	2,8	0,6	12,5	29,9	6,4	12,5	8,6	26,8
PUSGD	2,3	-	8,8	15,7	2,6	14,3	5,0	51,4
PUPGD	5,5	3,5	15,7	31,6	9,2	15,5	19,0	ND
PU100R	0,8	-	6,0	75,3	2,5	8,3	7,0	ND
PU100E	5,6	-	18,5	67,1	1,4	7,5	-	ND
PU300R	1,0	-	0,6	80,8	2,9	7,3	7,3	ND
PU30E	7,3	1,5	15,0	5,9	5,4	38,7	19,7	6,6
PU500R	1,6	0,4	2,2	38,4	0,9	3,4	3,40	49,7

NOTA: Análise dos acetatos de alditóis por GC-MS.¹Determinação de ácidos urônicos segundo metodologia descrita por Filisetti-Cozzi e Carpita (1991). Rha (ramnose), Fuc (Fucose), Ara (arabinose), Xyl (xilose), Man (manose), Gal (galactose), Glc (glucose), GalA (ácido galacturônico) e ND (não determinado).

A fração PU30E, devido ao elevado teor de galactose e arabinose demonstrada pela análise de composição monossacarídica, pode conter em sua composição uma arabinogalactana. Na fração PU500R, o alto teor de GalA sugere a presença de homogalacturonanas e o elevado teor de xilose sugere a presença de uma xilana, ou até mesmo uma xilogalacturonana.

5.2.2.2 ANÁLISE DE RMN DE CORRELAÇÃO DIRETA ¹³C-¹H (HSQC)

A fração PU500R, que apresentou perfil heterogêneo na análise de homogeneidade foi analisada por RMN, no experimento de ¹H/¹³C HSQC (FIGURAS 16 e 17). A fração PU500R foi primeiramente solubilizada em água deuterada, gerando a fração PU500w. Os sinais encontrados para C-1/H-1 em δ 101,8/5,11; C-2/H-2 δ 71,2/3,78; C-3/H-3 δ 71,8/4,01; C-4/H-4 δ 80,9/4,45 e C-5/H-5 δ 74,2/4,74

sugerem a presença de um polissacarídeo constituído por α -(1 \rightarrow 4)-D-GalpA. O sinal em δ 55,5/3,84 corresponde ao grupo -COO-CH₃ e o sinal em δ 101,8/5,05 corresponde ao C-1/H-1 das unidades de GalA metilesterificadas (TAMAKI *et al.*, 2008). O cálculo do grau de esterificação da molécula foi realizado através da integração dos sinais C-1/H-1 de GalA e C-1/H-1 de GalAe, gerando um resultado de 5,6%. Não houve detecção de unidades de xilose nestas condições de análise.

Portanto, de acordo com os resultados obtidos, o polissacarídeo encontrado nessas condições de análise na fração PU500w é uma homogalacturonana. Esse polissacarídeo é formado por uma cadeia principal formada de unidades de α -D-GalA (1 \rightarrow 4) ligadas com presença de algumas unidades de ácido galacturônico metilesterificadas (RIDLEY *et al.*, 2001; CHENG e NEISS, 2012; TAMAKI *et al.*, 2008).

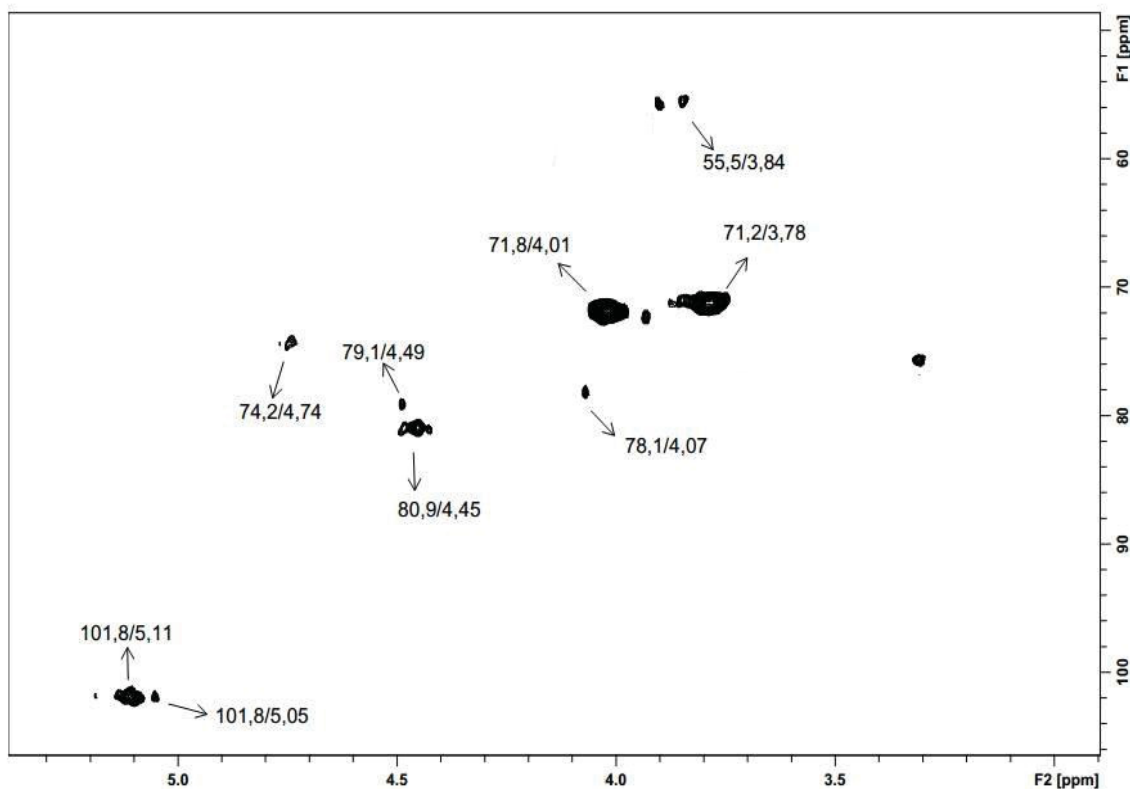


FIGURA 16: MAPA DE CORRELAÇÃO DIRETA ^{13}C - ^1H (HSQC) DA FRAÇÃO PU500R EM D₂O a 70°C, em espectrômetro de 600 MHz, com os deslocamentos químicos (δ) expressos em ppm.

A fração PU500R foi também solubilizada em DMSO-d₆, originando a fração PU500d, a qual foi submetida a análise de ¹H/¹³C HSQC (FIGURA 17). Os sinais em δ 65,6/3,65 e em δ 65,6/3,00 referem-se ao C-5/H-5 e o sinal em δ 101,6/4,15 corresponde ao C-1/H-1 de resíduos de β -D-Xylp (CORDEIRO *et al.*, 2015; SIMAS *et al.*, 2006). Xilanas de plantas são normalmente estruturas (1 \rightarrow 4) ligadas (DEY *et al.*, 1997), contudo os outros sinais observados no HSQC não são correspondentes aos sinais já descritos na literatura para C-2/H-2, C-3/H-3 e C-4/H-4 de unidades de β -(1 \rightarrow 4)-D-Xylp.

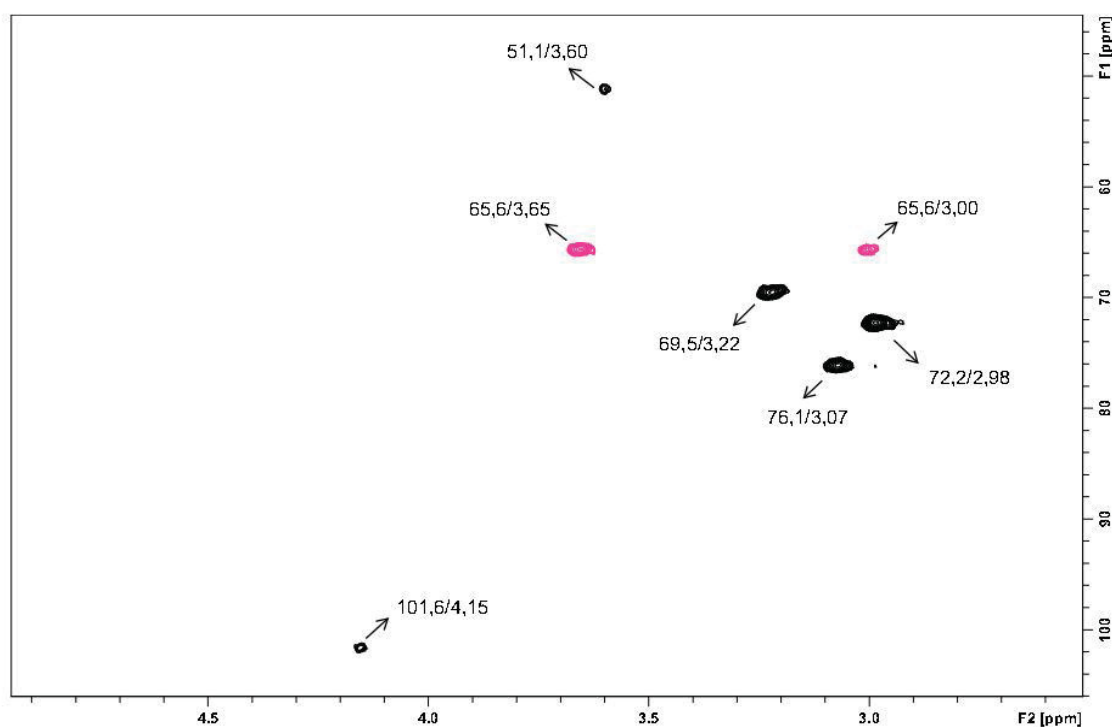


FIGURA 17: MAPA DE CORRELAÇÃO DIRETA ¹³C-¹H (HSQC) DA FRAÇÃO PU500R EM DMSO-d₆, a 70 °C, em espectrômetro de 600 MHz. Os deslocamentos químicos (δ) estão expressos em ppm. Os sinais em rosa representam -CH₂- no HSQC-DEPT.

5.2.2.3 ANÁLISE DE METILAÇÃO

O resultado da análise de metilação da fração PU500R demonstra que os resíduos de xilose são (1→4) ligados. Estes dados revelam uma homoxilana linear com ligação (1→4).

Os derivados metilados 2,3-Me₂-Xyl e 3,4-Me₂-Xyl apresentam o mesmo tempo de retenção. Para diferenciação desses derivados, o processo de redução foi feito utilizando boroidreto de sódio deuterado, permitindo que os dois derivados apresentem perfis de fragmentação diferentes. O derivado 2,3-Me₂-Xyl apresenta fragmentos principais de m/z 118 e 129, enquanto 3,4-Me₂-Xyl apresenta 117 e 130. Desta forma, foi possível diferenciar e confirmar a presença do derivado 2,3-Me₂-Xyl, conforme pode ser visualizado na FIGURA 18.

A presença de derivados metilados de terminais não redutores de xilose, sem a indicação de pontos de ramificação na xilana, e de unidades de galactose (1→4) ligados precisam ser melhor investigados.

TABELA 3 – ACETATOS DE ALDITÓIS PARCIALMENTE METILADOS OBTIDOS POR ANÁLISE DE METILAÇÃO DE PU500R.

tR	Derivado metilado	Tipo de ligação	%
11,176	2,3,4-Me ₃ -Xyl	→1)-Xylp	33,70
12,740	2,3-Me ₂ -Xyl	→4)-Xylp-(1→	54,27
14,869	2,3,6-Me ₃ -Gal	→4)-Galp-(1→	12,03

NOTA: Os tempos de retenção foram comparados com os padrões de alditóis acetato parcialmente metilados de cada um dos monossacarídeos e os padrões de fragmentação foram comparados com aqueles obtidos por SASSAKI *et al.*, 2009.

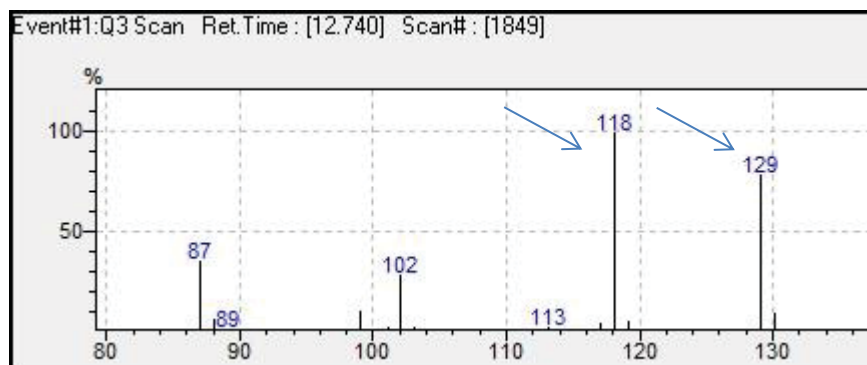


FIGURA 18: PERFIL DE FRAGMENTAÇÃO OBTIDO DO DERIVADO METILADO 2,3 Me₂-Xyl (OBSERVADO NA ANÁLISE DE METILAÇÃO DE PU500R).

Os resultados mostrados permitiram evidenciar a presença de uma xilana na fração PU500d. Esse polissacarídeo é formado por uma cadeia linear de unidades β -(1 \rightarrow 4)-D-Xylp. A fração PU500R é, portanto, formada por uma homogalacturonana e por uma xilana linear.

Apesar de evidenciada a presença de monossacarídeos na análise de composição monossacarídica da fração PU30E, não foram observados sinais de polissacarídeos nas análises de RMN. Em adição, os resultados de metilação também não demonstraram a presença de derivados parcialmente metilados.

5.2 RESULTADOS DE *P. regnellii*

5.2.1 EXTRAÇÃO E FRACIONAMENTO DOS POLISSACARÍDEOS

Com a finalidade de obter polissacarídeos em frações isoladas, as folhas secas e trituradas de *P. regnellii* tiveram seus compostos solúveis extraídos em água, com a sucessão de diversas etapas de purificação. O fluxograma a seguir (FIGURA 19) demonstra resumidamente a estratégia de fracionamento adotada.

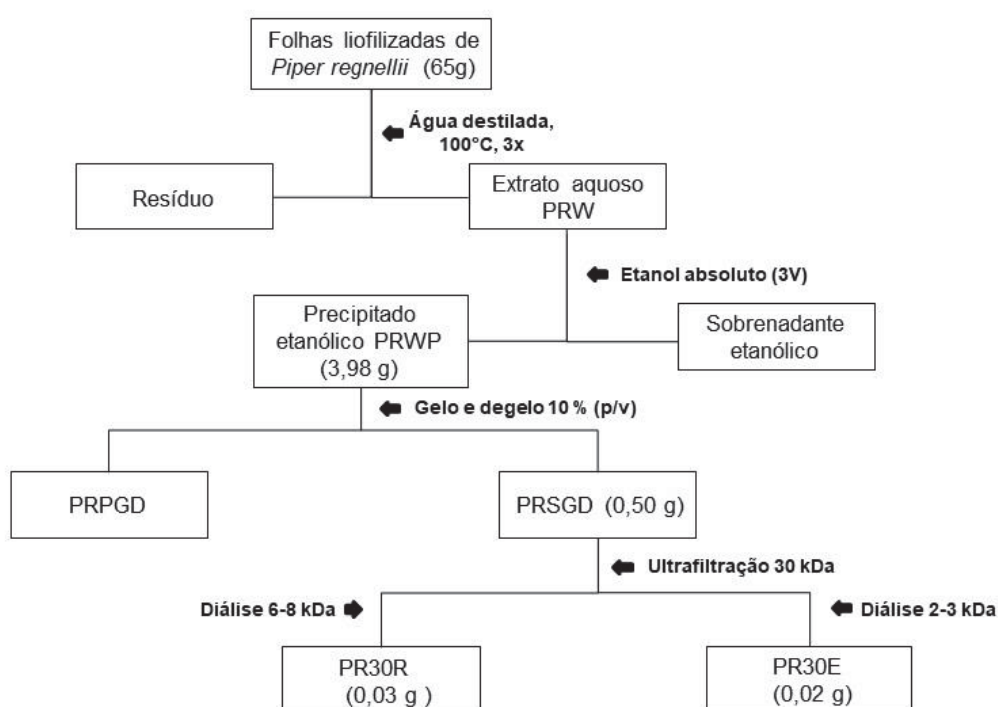


FIGURA 19: FLUXOGRAMA DO PROCEDIMENTO DE EXTRAÇÃO AQUOSA E PURIFICAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS DE *P. regnellii*.

Uma vez extraídos com água, os compostos de alta massa foram separados dos de baixa massa molecular, com uso de etanol absoluto gelado. A fração precipitada (PRWP), a qual continha os polissacarídeos, foi liofilizada e submetida a diferentes processos de fracionamento e purificação.

Sequencialmente, foi feito o processo de congelamento e degelo para a fração PRWP, derivando duas novas frações: uma solúvel em água fria (PRSGD) e outra insolúvel em água fria (PRPGD). A fração solúvel foi analisada quanto à sua

composição monossacarídica (apresentada à frente) e ao seu perfil de eluição em HPSEC (FIGURA 20). A fração demonstrou perfil de eluição heterogêneo.

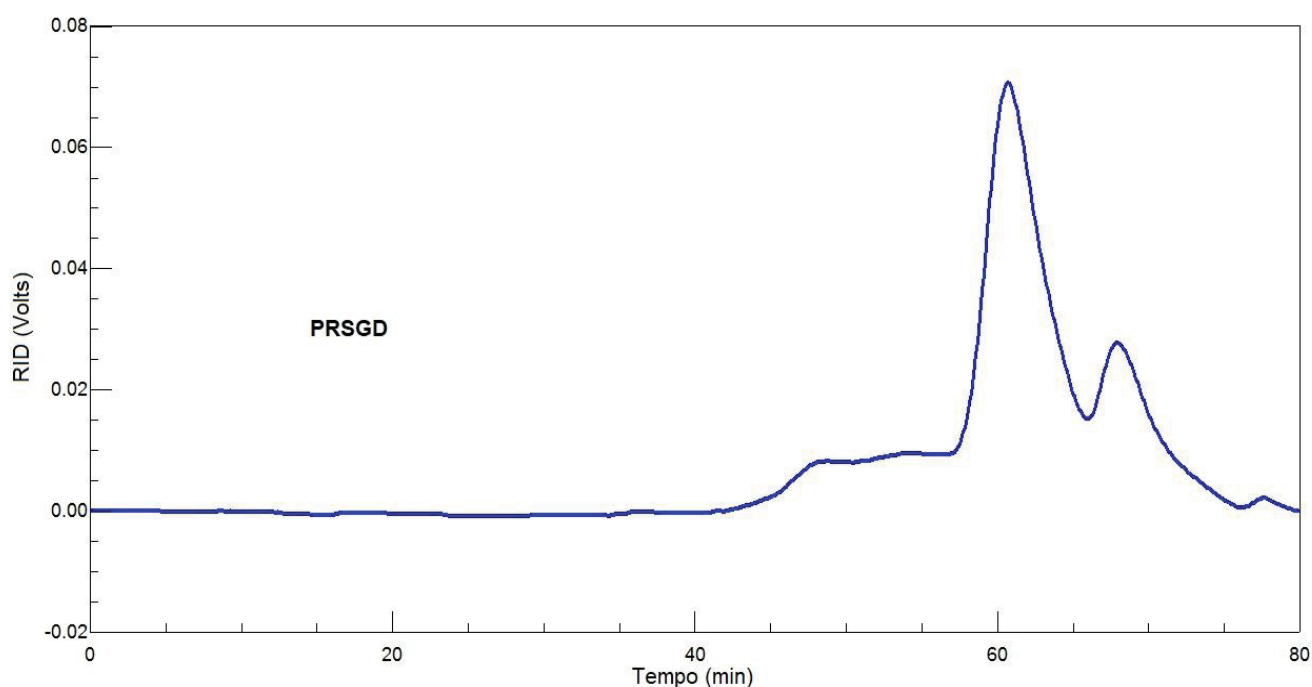


FIGURA 20: PERFIL DE ELUIÇÃO EM HPSEC, UTILIZANDO DETECTOR DE ÍNDICE DE REFRAÇÃO (RID) DA FRAÇÃO PRSGD.

A fração PRSGD foi submetida a um procedimento de ultrafiltração, utilizando uma membrana com limite de exclusão de 30 kDa, originando as frações eluída, PR30E, e retida, PR30R. Estas frações tiveram seus perfis de eluição avaliados por HPSEC. A imagem abaixo (FIGURA 21) mostra os perfis de eluição homogêneos de PR30E, com presença de um pico principal em aproximadamente 55 minutos e de PR30R, com pico principal em aproximadamente 50 minutos. A massa molecular de PR30R foi determinada, encontrando-se um valor de M_w de 164.000 g/mol ($dn/dc = 0,140$).

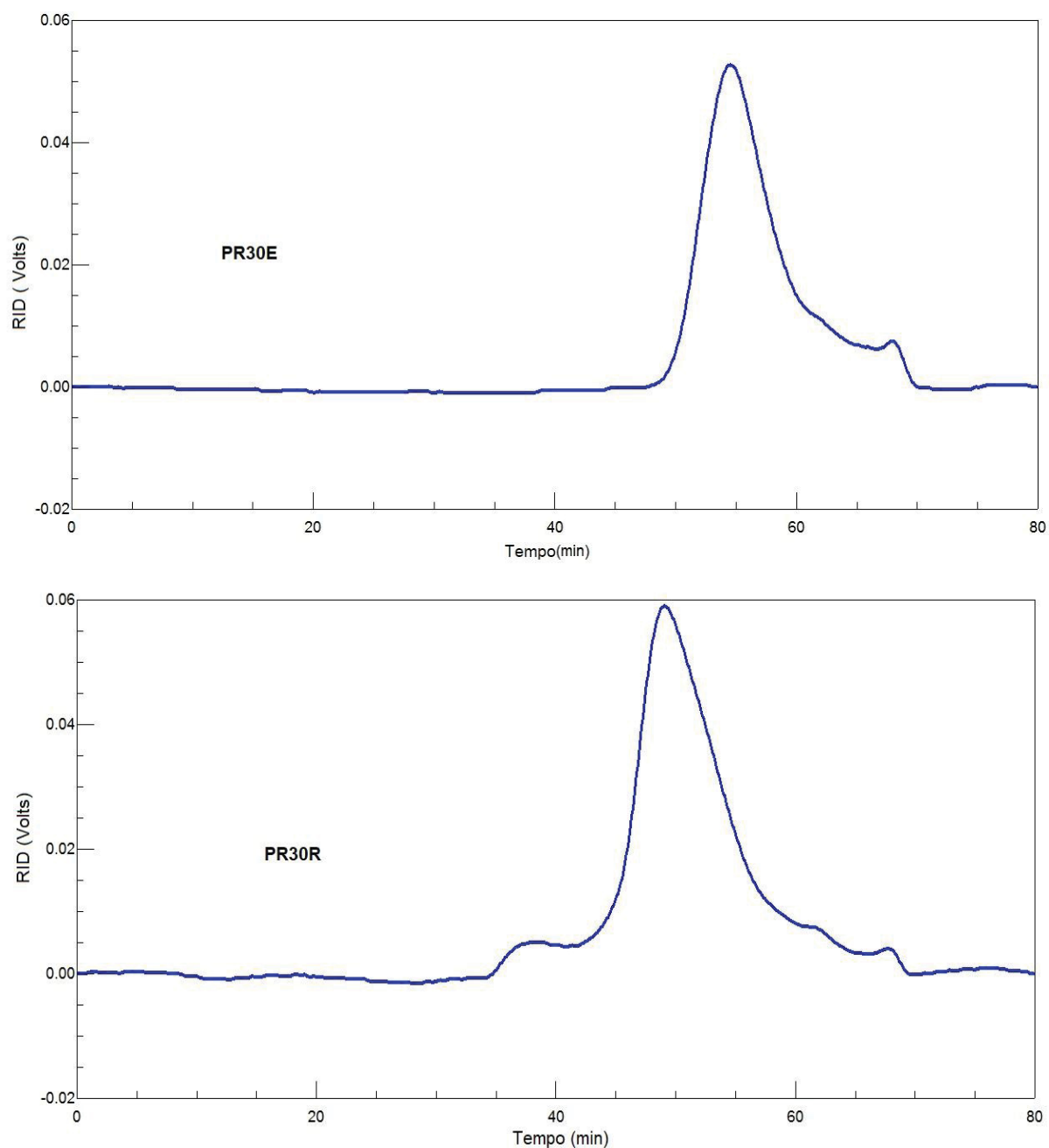


FIGURA 21: PERFIS DE ELUIÇÃO EM HPSEC, UTILIZANDO DETECTOR DE ÍNDICE DE REFRAÇÃO (RID) DAS FRAÇÕES PR30E e PR30R.

Os rendimentos das frações obtidas a partir da extração aquosa de 65 g de folhas liofilizadas podem ser vistos na TABELA 4 a seguir. Houve perda de material em todas as etapas do fracionamento.

TABELA 4: RENDIMENTO DAS FRAÇÕES ORIGINADAS A PARTIR DA EXTRAÇÃO AQUOSA DAS FOLHAS DE *P. regnellii*.

Fração	Rendimento	
	(g)	(%)
PRWP	3,98	6,12
PRSGD	0,50	2,48
PRPGD	1,61	0,76
PR30R	0,03	0,07
PR30E	0,02	0,03

Nota: Rendimento calculado a partir de 65 g de folhas secas.

5.2.2 CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DOS POLISSACARÍDEOS

5.2.2.1 COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA

A fração PRWP teve parte do seu material hidrolisado destinado à análise de TLC. É possível verificar a presença dos monossacarídeos arabinose, galactose e ácido galacturônico, permitindo a identificação e diferenciação do tipo de ácido urônico presente na fração. Este resultado pode ser visualizado na figura a seguir (FIGURA 22).

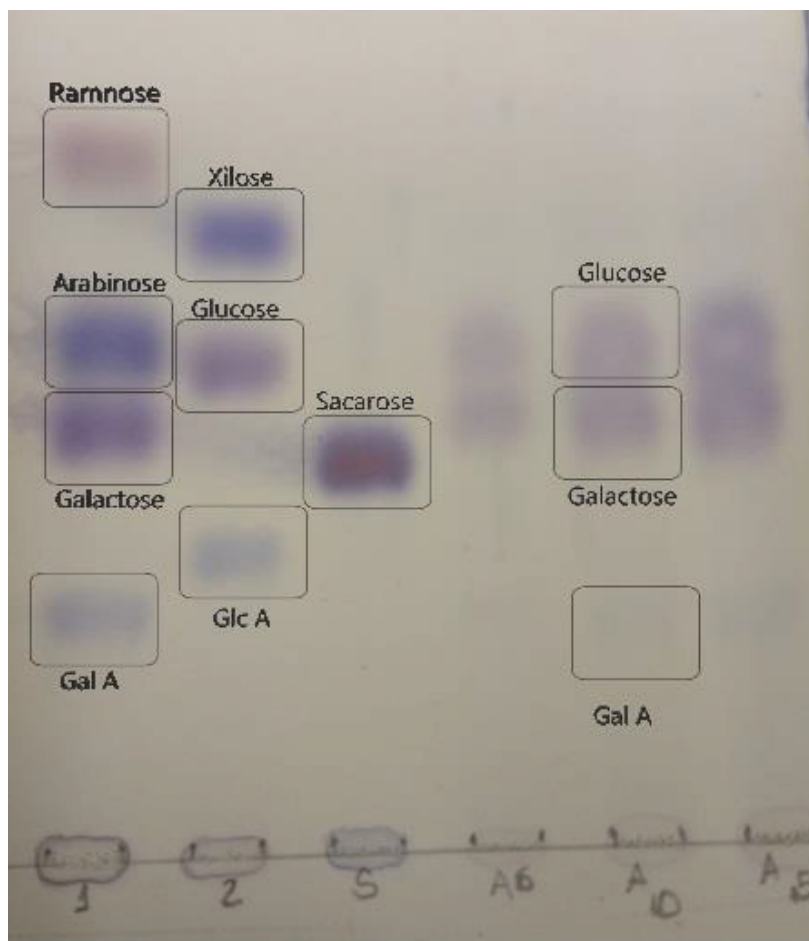


FIGURA 22 – TLC DA FRAÇÃO PRWP HIDROLISADA (TFA 2 M , 8 h a 100°C). TLC DA FRAÇÃO PRWP HIDROLISADA (TFA 2 M, 8 h a 100 °C). A banda 1 refere-se aos padrões de ramnose, arabinose, galactose e ácido galacturônico. A banda 2, aos padrões de xilose, glucose e ácido glucurônico. A banda 5, ao padrão de sacarose. As bandas A6, A10 e A15, à fração PRWP hidrolisada, variando-se o número de aplicações. Fase móvel: ácido acético:1-propanol:acetato de etila:água (4:2:2:1). Revelador: orcinol-ácido sulfúrico a 100 °C.

A composição monossacarídica de todas as frações obtidas está relacionada na tabela abaixo (TABELA 5). Os monossacarídeos neutros foram analisados por GC/MS nas suas formas derivatizadas de acetatos de alditóis e os monossacarídeos ácidos foram quantificados por metodologia descrita por Filisetti-Cozzi e Carpita (1991).

TABELA 5: COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES OBTIDAS A PARTIR DA EXTRAÇÃO AQUOSA DAS FOLHAS DE *P. regnellii*.

Fração	Monossacarídeos (%)							
	Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc	GalA'
PRWP	-	-	9,7	1,6	5,1	24,9	41,1	16,8
PRSGD	2,1	-	9,8	1,2	3,7	25,2	6,8	51,4
PRPGD	2,6	-	15,2	1,4	10,1	22,2	48,6	ND
PR30R	1,6	1,5	24,9	1,35	2,9	51,5	5,0	11,3
PR30E	19,7	2,8	10,2	1,6	10,9	18,0	36,9	ND

NOTA: Análise dos acetatos de alditóis por GC-MS. ¹ Determinação de ácidos urônicos segundo metodologia descrita por Filisetti-Cozzi e Carpita (1991). Rha (ramnose), Fuc (Fucose), Ara (arabinose), Xyl (xilose), Man (manose), Gal (galactose), Glc (glucose) e GalA (ácido galacturônico), ND (não determinado).

Os principais monossacarídeos observados na fração PR30R são arabinose galactose e ácido galacturônico. A presença de arabinose e galactose podem sugerir que uma arabinogalactana seja constituinte da fração. As arabinogalactanas podem estar associadas às ramnogalacturonanas, por meio de ligação glicosídica entre a cadeia de galactose da arabinogalactana e um resíduo de ramnose da ramnogalacturonana (CARPITA E GIBEAUT, 1993). A presença de altos teores de ácido galacturônico na fração PR30R sugere a presença de homogalacturonanas e/ou ramnogalacturonanas, com unidades de ramnose intercaladas na cadeia de GalA, característica típica de ramnogalacturonana tipo I (RG-I). As RG-I podem ser constituídas por longos segmentos de $[\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-D-GalpA-(1}\rightarrow]$, intercalados por unidades de $[\rightarrow 2)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap-(1}\rightarrow]$. As unidades de arabinose e galactose podem fazer parte de polissacarídeos neutros que ramificam a RG-I. A ramificação das RG-I por polissacarídeos neutros frequentemente ocorre na posição O-4 de algumas unidades de ramnose (CARPITA *et al.*, 2015).

5.2.2.2 ANÁLISE DE RMN DE CORRELAÇÃO DIRETA ^{13}C - ^1H (HSQC)

O mapa de correlação direta de C^{13}/H^1 (HSQC) da fração PR30R (FIGURA 23) demonstra, na região anomérica, sinais em δ 109,5/5,25 e δ 108,3/5,08

correspondentes ao C-1/H-1 de unidades de α -L-Araf; em δ 103,5/4,47 e δ 104,1/4,69 ao C-1/H-1 de β -D-Galp (RENARD *et al.*, 1998; OVODOVA *et al.*, 2009; POPOV *et al.*, 2011). Em δ 101,8/5,10 pode-se observar o sinal relativo a unidades de β -L-Araf (DAS *et al.*, 2013; CARDOSO *et al.*, 2002). Em δ 82,4/3,89 pode ser observado o sinal de C-3/H-3 das unidades de β -D-Galp 3-O-substituídas e em δ 67,1/3,89 e δ 67,0/3,81 são observados sinais de C-6/H-6 das unidades 6-O-substituídas (DELGOBO *et al.*, 1998). O sinal em δ 96,5/4,57 pode ser atribuída a unidades terminais redutores de β -Galp (SASSAKI *et al.*, 2014). Estes sinais sugerem a presença de uma arabinogalactana tipo II.

Os sinais em δ 100,4/4,96 e δ 99,5/5,13 são característicos do C-1/H-1 de resíduos de α -D-GalpA metilesterificada e não metilesterificada, respectivamente. O sinal em δ 53,2/3,80 é relativo ao grupo metil das unidades metilesterificadas de ácido galacturônico. O sinal de C-5/H-5 das unidades de $\rightarrow 4$)- α -D-GalpA-6-OMe (1 \rightarrow aparecem em δ 70,8/5,12 e 70,9/5,06. (RENARD *et al.*, 1998; OVODOVA *et al.*, 2009; POPOV *et al.*, 2011). A presença de unidades de α -D-GalpA-4-O-substituídas foi confirmada pelo sinal em δ 79,1/4,45 (C-4/H-4 substituído). O sinal de C-6/H-6 das unidades de α -L-Rhap é visualizado em 16,9/1,26 (RENARD *et al.*, 1998; OVODOVA *et al.*, 2009; POPOV *et al.*, 2011). Estes sinais, mais os dados de composição monossacarídica, sugerem a presença de uma ramnogalacturonana tipo I, constituída por segmentos de GalpA intercalados por unidades de Rhap.

Integrando os sinais de C-1/H-1 das unidades metil e não metilesterificadas de GalA, foi possível calcular grau de esterificação de 70,54%.

A análise de RMN de ^{13}C - ^1H (HSQC) confirmou a presença de unidades de ácido galacturônico 4-O-substituídas e de unidades de galactose 3-O- e 6-O-substituídas. Esses padrões são observadas em ramnogalacturonanas tipo I e arabinogalactanas tipo II. Como discutido anteriormente, arabinogalactanas comumente ramificam as RGI em suas unidades de ramnose.

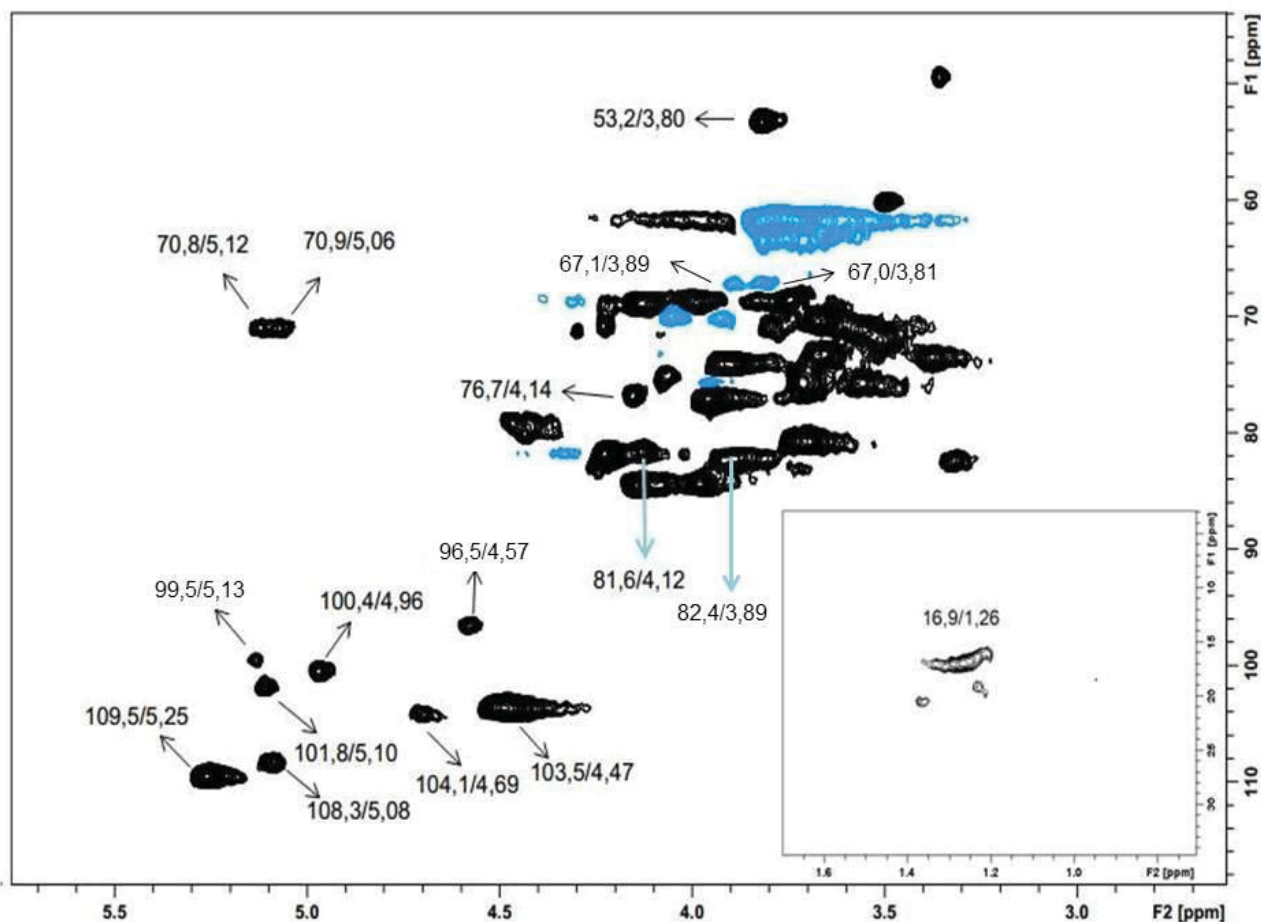


FIGURA 23 - MAPA DE CORRELAÇÃO DIRETA ^{13}C - ^1H (HSQC) DA FRAÇÃO PR30R. A análise foi executada em D_2O , a 50°C , em espectrômetro de 400 MHz. Os deslocamentos químicos (δ) são expressos em ppm. Sinais em azul representam $-\text{CH}_2-$ no HSQC-DEPT.

5.2.2.3 ANÁLISE DE METILAÇÃO

Apesar da análise de metilação da fração PR30R (TABELA 6) ter mostrado uma elevada quantidade de terminais não redutores em relação aos pontos de ramificação, indicando necessidade de repetição da análise, algumas conclusões puderam ser obtidas. A análise mostrou que as unidades de galactose da fração PR30R são principalmente 3-O-, 6-O-, e 3,6-di-O-substituídas, resultado característico de arabinogalactana do tipo II (ASPINALL, 1973; CARPITA e GIBEAUT, 1993). O derivado metilado 2,4,6-Me₃-Gal sugere ligação (1→3) e é relativo a cadeia principal da AG-II. Os resíduos de arabinose da cadeia lateral encontram-se principalmente 3-O-substituídos, ou como terminais não redutores. O derivado 2,3,4-Me₃-Gal refere-se à cadeia lateral da molécula, constituída por ligações (1→6) entre os resíduos de galactose. O derivado metilado de 2,3,4,6-Me₄-

Glc pode ser correspondente a unidades de glucose ligadas na estrutura como terminais não redutores. A estrutura sugerida, com base na análise de metilação e RMN, está representada na FIGURA 24 e demonstra como estão ligados os resíduos entre si nos dois polímeros. A proporção entre eles ainda precisa ser melhor investigada.

TABELA 6: ACETATOS DE ALDITÓIS PARCIALMENTE METILADOS OBTIDOS POR ANÁLISE DE METILAÇÃO DE PR30R.

tR	Derivado metilado	Tipo de ligação	%
10,563	2,3,5-Me ₃ -Ara	Araf-(1→	60,34
11,218	2,3,4-Me ₃ -Ara	Arap-(1→	2,13
12,147	2,5-Me ₂ -Ara	→3)-Araf-(1→	8,14
13,333	2,3,4,6-Me ₄ -Glc	Glc _p -(1→	3,41
13,664	2,3,4,6-Me ₄ -Gal	Gal _p -(1→	16,46
15,008	2,4,6-Me ₃ -Gal	→1)-Gal _p -(3→	2,82
15,592	2,3,4-Me ₃ -Gal	→1)-Gal _p -(6→	5,45
16,857	2,4-Me ₂ -Gal	→3,6)-Gal _p -(1→	1,25

NOTA: Os tempos de retenção foram comparados com os padrões de alditóis acetato parcialmente metilados de cada um dos monossacarídeos e os padrões de fragmentação foram comparados com aqueles obtidos por SASSAKI *et al.*, 2009.

Apesar de evidenciada a presença de monossacarídeos na análise de composição monossacarídica da fração PR30E, não foram observados sinais de polissacarídeos nas análises de RMN. Em adição, os resultados de metilação não demonstraram a presença de derivados parcialmente metilados.

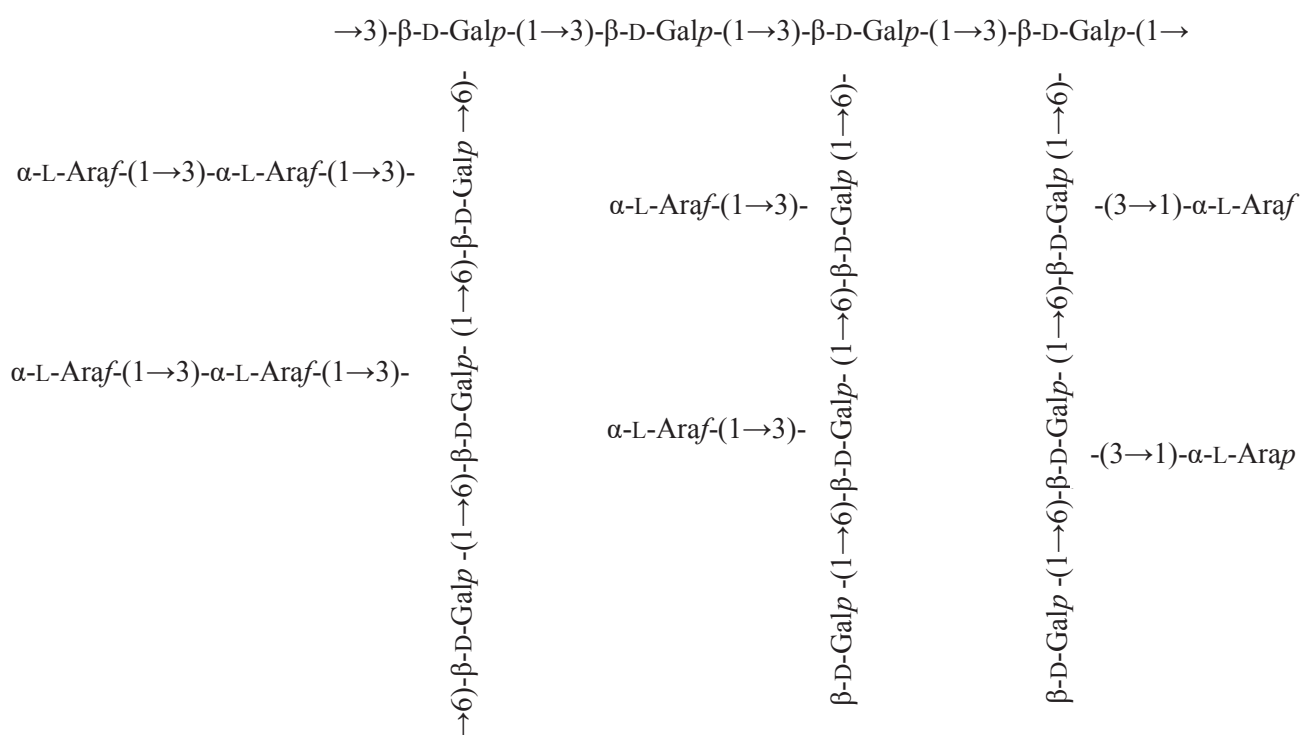


FIGURA 24: ESTRUTURAS SUGERIDAS PARA OS POLISSACARÍDEOS ISOLADOS NA FRAÇÃO PR30R: uma arabinogalactana tipo II (AG-II) e uma ramnoglacturonana tipo I (RG-I).

5.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DOS EXTRATOS DE *P.umbellatum*

5.3.1 ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DAS FRAÇÕES PUSGD E PU500R

As folhas de *Piper umbellatum* tem como uma das suas indicações populares o uso em quadros agudos de dor e inflamação. Em função disso, foi avaliada a atividade anti-inflamatória e antinociceptiva dos polissacarídeos isolados das folhas da planta, utilizando o modelo de inflamação induzida por administração intraperitoneal de ácido acético em camundongos.

A administração intraperitoneal de ácido acético induziu nocicepção intensa evidenciada por contorções e extensão de patas traseiras e dianteiras nos animais.

O ácido acético é utilizado como agente nocivo para promover nocicepção inflamatória visceral, o qual é capaz de ativar canais ASIC e TRPV-1 expressos em nociceptores polimodais periféricos, além de promover a liberação de diversos mediadores pró-inflamatórios, como bradicinina, prostaglandina e citocinas (COLLIER *et al.*, 1968; RIBEIRO *et al.*, 2000). O pré-tratamento com dexametasona, um anti-inflamatório esteroideal pertencente à classe dos corticóides, utilizado como controle positivo no experimento, reduziu o número de contorções em 46,7% (DEXA: $21,8 \pm 3,6$), quando comparado ao grupo veículo (V: $40,8 \pm 2,9$). De forma análoga, os pré-tratamentos com PUSGD nas doses 1 e 3 mg/kg foram capazes de reduzir o número de contorções em 59,0% (PUSGD 1 mg/kg: $16,7 \pm 2,9$) e 88,2% (PUSGD 3 mg/kg: $4,8 \pm 1,1$), respectivamente, de forma dose-dependente, quando comparados ao grupo veículo (FIGURA 25).

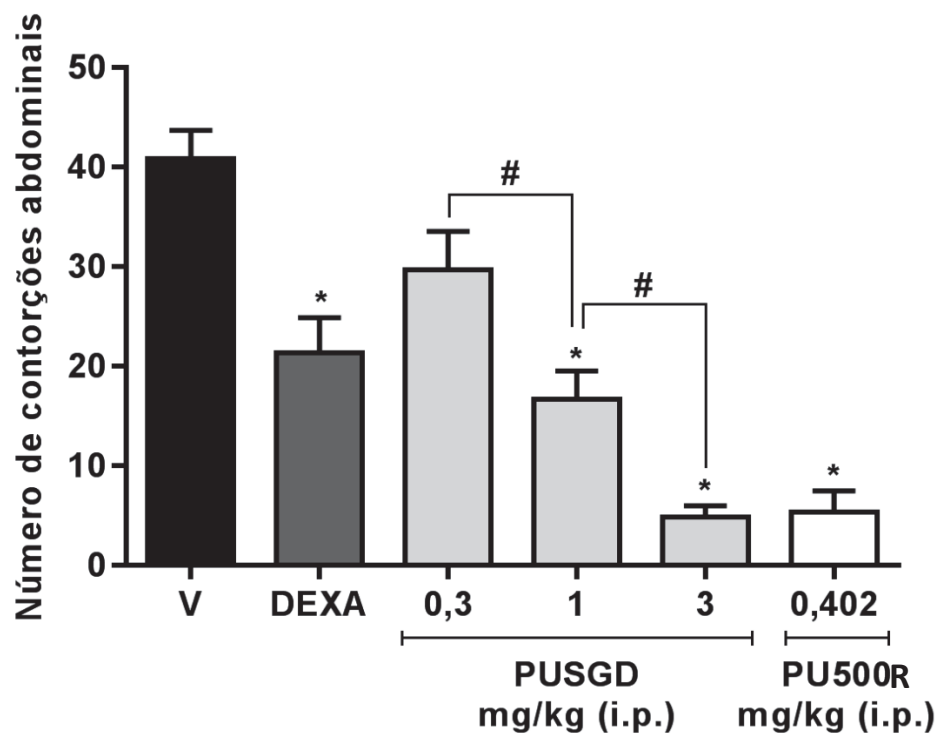


FIGURA 25: EFEITO DA INJEÇÃO INTRAPERITONEAL DE PUSGD E PU500R NA NOCICEPÇÃO INDUZIDA POR ÁCIDO ACÉTICO EM CAMUNDONGOS. Os animais foram pré-tratados intraperitonealmente (i.p.) com veículo (V: salina estéril 0,9%), dexametasona (DEXA: 1 mg/kg), PUSGD (0,3, 1,0 e 3,0 mg/kg) ou PU500R (0,402 mg/kg). Após 30 minutos, os animais receberam injeção de ácido acético 0,6%, e os comportamentos de contorção foram avaliados por 20 minutos. Os resultados estão expressos como médias ± erro padrão das médias (n = 6). A comparação entre os grupos foi realizada através da análise da variância (ANOVA) seguida do teste

de Bonferroni. * Diferente do grupo veículo para $p < 0,05$. # Diferente entre as doses testadas de PUSGD para $p < 0,05$.

Como parte do processo inflamatório induzido na cavidade peritoneal dos animais pela injeção de ácido acético, foi possível avaliar também o extravasamento plasmático (concentração de Azul de Evans na cavidade peritoneal) (FIGURA 26) e a migração celular (contagem de leucócitos peritonias) (FIGURA 27). O pré-tratamento com dexametasona reduziu significativamente o extravasamento vascular em 46,5% (V: $20,7 \pm 2,9 \mu\text{g/mL}$; DEXA: $11,7 \pm 1,5 \mu\text{g/mL}$) e o número de leucócitos em 45,8% (V: $7,2 \pm 1,0 \times 10^6$; DEX: $3,9 \pm 0,7 \times 10^6$) em relação ao grupo veículo. A administração de PUSGD, na dose de 3,0 mg/kg promoveu redução significativa tanto do número de leucócitos (PUSGD 3 mg/kg: $2,3 \pm 0,3 \times 10^6$) como do extravasamento plasmático (PUSGD 3 mg/kg: $6,6 \pm 0,7 \mu\text{g/mL}$), em 67,6 e 68,1%, respectivamente, quando comparados ao grupo veículo.

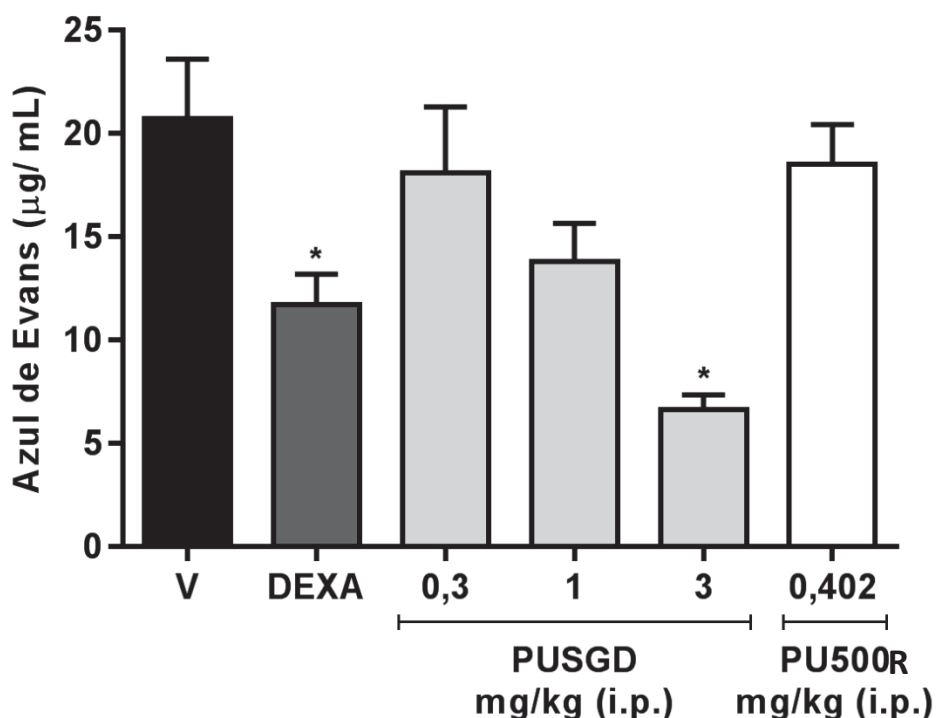


FIGURA 26: EFEITO DA INJEÇÃO INTRAPERITONEAL DE PUSGD E PU500R NO EXTRAVASAMENTO PLASMÁTICO INDUZIDO POR ÁCIDO ACÉTICO EM CAMUNDONGOS. Os animais foram pré-tratados intraperitonealmente (i.p.) com veículo (salina estéril 0,9%), dexametasona (1 mg/kg), PUSGD (0,3 , 1,0 e 3,0 mg/kg) ou PU500R (0,402 mg/kg). Após 30 minutos, os animais receberam injeção de ácido acético 0,6%. Passados 20 minutos, o líquido peritoneal foi removido e o extravasamento foi mensurado em espectrofotômetro (620 nm). Os

resultados estão expressos como médias \pm erro padrão das médias ($n = 6$). A comparação entre os grupos foi realizada através da análise da variância (ANOVA) seguida do teste de Bonferroni.

*Diferente do grupo veículo para $p < 0,05$.

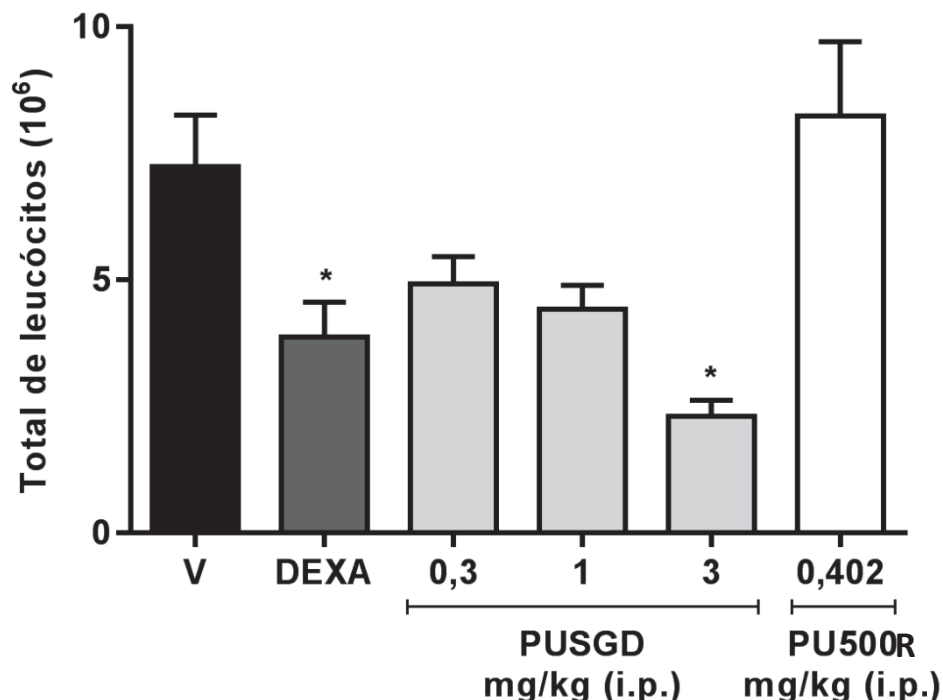


Figura 27: EFEITO DA INJEÇÃO INTRAPERITONEAL DE PUSGD E PU500R NA MIGRAÇÃO CELULAR INDUZIDA POR ÁCIDO ACÉTICO EM CAMUNDONGOS. Os animais foram pré-tratados intraperitonealmente (i.p.) com veículo (salina estéril 0,9%), dexametasona (1 mg/kg), PUSGD (0,3 , 1,0 e 3,0 mg/kg) ou PU500R (0,402 mg/kg). Após 30 minutos, os animais receberam injeção de ácido acético 0,6%. Passados 20 minutos, o líquido peritoneal foi removido e os leucócitos foram contabilizados em câmara de Neubauer. Os resultados estão expressos como médias \pm erro padrão das médias ($n = 6$). A comparação entre os grupos foi realizada através da análise da variância (ANOVA) seguida do teste de Bonferroni. *Diferente do grupo veículo para $p < 0,05$.

A escolha da fração PUSGD para realização do teste biológico se deu principalmente pelo fato de conter maior quantidade de polissacarídeos solúveis em água, permitindo verificar a possibilidade de atividade antinociceptiva de forma mais abrangente. Para examinar a atividade biológica da fração caracterizada PU500R, obtida através do fracionamento da fração PUSGD, a dose foi determinada a partir do seu rendimento (13,04% em relação à fração PUSGD) e utilizando como base a dose de 3 mg/kg de PUSGD, a qual demonstrou-se efetiva em todos os parâmetros avaliados. Sendo assim, obtivemos uma dose calculada em 0,402 mg/kg.

Inesperadamente, o pré-tratamento com PU500R apenas diminuiu significativamente o número de contorções (PU500R: $5,3 \pm 2,1$) sem alterar os parâmetros de migração celular e extravasamento vascular, em comparação ao grupo tratado com veículo.

Com os dados obtidos, foi possível comprovar a atividade anti-inflamatória e anti-nociceptiva da fração PUSGD. Em contrapartida, a fração PU500R demonstrou apenas resposta anti-nociceptiva, ou seja, apresenta apenas propriedade analgésica. Outras moléculas podem estar presentes em baixa quantidade na fração bruta, uma vez que PUSGD apresenta maior quantidade de polissacarídeos solúveis, ou ainda pode haver presença proteínas, ou outros metabólitos primários ou secundários ligados à estrutura dos polissacarídeos, que promovam a sua resposta anti-inflamatória. Uma outra hipótese seria a de que a fração PU500R, na dose testada, não apresentou diferença significativa nos parâmetros de extravasamento plasmático e migração celular, tornando necessária a avaliação com doses diferentes.

A atividade anti-inflamatória de polissacarídeos isolados de plantas, fungos e algas já foi descrita anteriormente na literatura. Carbonero *et al.* (2008) verificaram atividade anti-inflamatória de uma fucomanogalactana isolada do fungo *Lentinus edodes* no modelo de permeabilidade capilar peritoneal e migração leucocitária induzidas por ácido acético em camundongos. Ananthi *et al.* (2010) isolaram um polissacarídeo ácido de alga marinha que revelou atividade anti-inflamatória quando testado no modelo de edema de pata induzida por carragenina em ratos e no modelo de permeabilidade vascular promovida pelo ácido acético em camundongos. Oliveira *et al.*, (2017) testaram a atividade anti-inflamatória in vitro de polissacarídeos pécticos isolados de *Sedum dendroideum* e verificaram o efeito anti-inflamatório na presença de agentes pró-inflamatórios (TNF- α e IL-1 β), a prevenção da secreção de citocinas pró-inflamatórias e a manutenção da secreção de citocinas anti-inflamatórias (IL- 10) em células THP-1 estimuladas com LPS.

Com relação à atividade anti-nociceptiva exibida por polissacarídeos, Nascimento *et al.*, (2015), testou arabinogalactana isolada do tamarilo (*Solanum betaceum*) e constatou a redução significativa do número de contorções no modelo de nocicepção induzida por ácido acético em camundongos. Em outro estudo, Nascimento *et al.*, (2013) verificou o comportamento antinociceptivo ao testar uma

galactoarabinoglucuronoxilana utilizando o mesmo modelo em camungondos. Foi verificada a diminuição de $78\pm6\%$ do número de contorções em comparação ao grupo veículo utilizando uma dose de 10 mg/kg da fração polissacarídica.

As folhas de *P. regnellii*, também objeto de estudo deste trabalho, do mesmo modo que *P. umbellatum*, tem como uma das suas indicações populares o uso em quadros agudos de dor e inflamação. Por esta razão, a atividade biológica dos polissacarídeos isolados na fração PR30R, obtida através das folhas de *Piper regnellii*, será testada futuramente utilizando o mesmo modelo.

6 CONCLUSÃO

- Do extrato aquoso das folhas de *P. umbellatum* foram obtidas as frações purificadas PU500w e PU500d, após as etapas de fracionamento. As análises de caracterização estrutural demonstraram que os polissacarídeos presentes nessas frações são uma homogalacturonana e uma xilana, respectivamente. A fração PU30E apresentou uma composição monossacarídica sugestiva da presença de arabinogalactana, porém não foram evidenciados sinais de polissacarídeos nas análises de RMN e metilação;
- Do extrato aquoso das folhas de *P. regnellii* foram obtidas as frações PR30R e PR30E. A fração PR30E apresentou resultados característicos da presença de carboidratos nas análises iniciais, porém não foram evidenciados sinais de polissacarídeos nas análises de RMN e metilação. A fração PR30R, após fracionamento a partir do extrato aquoso bruto, demonstrou a presença de uma arabinogalactana tipo II ligada a uma ramnogalacturonana tipo I nas análises de RMN e metilação.
- A fração PUSGD, obtida a partir do extrato aquoso das folhas de *P. umbellatum*, apresentou atividade anti-inflamatória e antinociceptiva, confirmando o uso popular da planta para este fim. A fração derivada de PUSGD, PU500R, apresentou somente resposta analgésica, indicando que na fração PUSGD pode haver outras moléculas ou outros polissacarídeos responsáveis pela atividade anti-inflamatória.

REFERÊNCIAS

- ADAMI, E.R.; CORSO, C.R.; TURIN-OLIVEIRA, N.M.; GALINDO, C.M.; MILANI, L.; STIPP, M.C.; NASCIMENTO, G.E.; CHEQUIN, A.; da SILVA, L.M.; de ANDRADE, S.F.; DITTRICH, R.L.; QUEIROZ-TELLES, J.E.; KLASSEN, G.; RAMOS, E.A.S.; CORDEIRO, L.M.C.; ACCO, A. Antineoplastic effect of pectic polysaccharides from green sweet pepper (*Capsicum annuum*) on mammary tumor cells *in vivo* and *in vitro*. **Carbohydrate polymers**, v. 201, p. 280-292, 2018.
- AGBOR, G. A., VINSON, J. A., SORTINO, J., JOHNSON, R., 2012. Antioxidant and antiatherogenic activities of three *Piper* species on atherogenic diet fed hamsters. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 64, 387–391, 2012.
- AGRA, M. F., FREITAS, P. F., BARBOSA-FILHO, J. M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.17, p. 114–140, 2007.
- ANANTHI, S.; RAGHAVENDRAN, H. R. B. R.; SUNIL, A. G. GAYATHRI, G. R.; VASANTHI, H. R. In vitro antioxidant and in vivo anti-inflammatory potential of crude polysaccharide from *Turbinaria ornata* (marine brown alga). **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, p. 187-192, 2010.
- ASPINALL, G. O. Structural chemistry of the hemicelluloses. **Advances in Carbohydrate Chemistry**. New York, p. 429-430, 1959.
- ASPINALL, G. O. In: **Biogenesis of Plant Cell Wall Polysaccharides**. New York: Academic Press, p. 95-115, 1973.
- ASPINALL, G. O. Chemistry of cell wall polysaccharides. In: STUMPF, P.K.; CONN, E.E. **The Biochemistry of Plants**. New York: Academic Press, 1980. v. 3, p. 473-500.

AVIGAD, G.; DEY, P. M. Carbohydrate metabolism: storage carbohydrates. In: DEY, P. M.; HARBORNE, J. B. **Plant Biochemistry**. Bristol: Academic Press, p. 143, 1997.

BALDOQUI, D. C.; BOLZANI, V. da S.; FURLAN, M.; KATO, M. J.; MARQUES, M. O. M. Flavonas, lignanas e terpeno de *Piper umbellata* (Piperaceae). **Química Nova**, v. 32, n. 5, p. 1107-1109, 2009.

BARDDAL, H.P.O.; GRACHER, A.H.P.; SIMAS-TOSIN, F.F.; IACOMINI, M.; CIPRIANI, T.R. Anticoagulant activity of native and partially degraded glycolglucuronomannan after chemical sulfation. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 80, p. 328-333, 2015.

BARDELLI, K. C.; KIRIZAWA, M.; SOUSA, A. V. G. O gênero Piper L. (Piperaceae) da Mata Atlântica da Microbacia do Sítio Cabuçu-Proguaru, Guarulhos, SP, Brasil. **Hoehnea**, v. 35, n. 4, p. 553-561, 2008.

BENEVIDES, P. J. C.; SARTORELLI, P.; KATO, M. J. Phenylpropanoids and neolignans from *Piper regnellii*. **Phytochemistry**, v. 52, p. 339-343, 1999.

BERGAMO, D. C. B.; KATO, M. J.; BOLZANI, V. S.; FURLAN, M. Biosynthetic origins of the isoprene units of 4-nerolidylcatechol in *Potomorphe umbellata*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 16, n. 6B, p. 1406-1409, 2005.

BEZERRA, I.L.; CAILLOT, A.R.C.; PALHARES, L.C.G.F.; SANTANA-FILHO, A.P.; CHAVANTE, S.F.; SASSAKI, G.L. Structural characterization of polysaccharides from Cabernet Franc, Cabernet Sauvignon and Sauvignon Blanc wines: Anti-inflammatory activities in LPS stimulated RAW 264.7 cells. **Carbohydrate Polymers**, v. 186, p. 91-99, 2018.

BIESKI, I.G.C.; LEONTI, M.; ARNASON, J.T.; FERRIER, J.; RAPINSKI, M.; VIOLANTE, I.M.P.; BALOGUN, S.O.; PEREIRA, J.F.C.A.; FIGUEIREDO, R.C.F.; LOPES, C.R.A.S.; da SILVA, D.R.; PACINI, A.; ALBUQUERQUE, U.P.; MARTINS, D.T.O. Ethnobotanical study of medicinal plants by population of Valley of Juruena Region, Legal Amazon, Mato Grosso, Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 173, p. 383-423, 2015.

CAFFALL, K. H.; MOHNEN, D. The structure, function, and biosynthesis of plant cell wall pectic polysaccharides. **Carbohydrate Research**, v. 344, p. 1879-1900, 2009.

CAILLOT, A.R.C.; BEZERRA, I.L.; PALHARES, L.C.G.F.; SANTANA-FILHO, A.P.; CHAVANTE, S.F.; SASSAKI, G.L. Structural characterization of blackberry wine polysaccharides and immunomodulatory effects on LPS-activated RAW 264.7 macrophages. **Food Chemistry**, v. 257, p. 143-149, 2018.

CARBONERO, E. R.; GRACHER, A. H. P.; KOMURA, D. L.; MARCON, R.; FREITAS, C. S.; BAGGIO, C. H.; SANTOS, A. R. S.; TORRI, G.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. *Lentinus edodes* heterogalactan: antinociceptive and anti-inflammatory effects. **Food Chemistry**, v. 111, p. 531-537, 2008.

CARDOSO, S.M.; SILVA, A.M.S.; COIMBRA, M.A. Structural characterisation of the olive pomace pectic polysaccharide arabinan side chains. **Carbohydrate Research**, v. 337, p. 917-924, 2002.

CARPITA, N. C.; RALPH, J.; McCANN, M C. The cell wall. In: BUCHANAN, B. B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. L. **Biochemistry & Molecular Biology of Plants**. USA: Courier, 2 ed., p. 45-108, 2015.

CARPITA, N. C.; GIBEAUT, D. M. Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. **Plant Journal**, v. 3, p. 1-30, 1993.

CHEN, F.; HUANG, G. The antiviral activity of polysaccharides and their derivatives. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 115, p. 77-82, 2018.

CHEN, F.; HUANG, G. Antioxidant activity of polysaccharides from different sources of ginseng. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 125, p. 906-908, 2019.

CHENG, H.; NEISS, T.G. Solution NMR spectroscopy of food polysaccharides. **Polymer Reviews**, v. 52, n. 2, p. 81-114, 2012.

CIPRIANI, T. R., MELLINGER, C. G.; SOUZA, L. M.; BAGGIO, C. H.; FREITAS, C. S.; MARQUES, M. C. A.; GORIN, P. A. J.; SASSAKI, G. L.; IACOMINI, M. A. Polysaccharide from a Tea (Infusion) of *Maytenus ilicifolia* Leaves with Anti-ulcer Protective Effects. **Journal of Natural Products**, v. 69, p. 1018-1021, 2006.

CIUCANU, I.; KEREK, F. A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates. **Carbohydrate Research**, v. 131, p. 209-217, 1984.

COLLIER, H. O., DINNEEN, L. C., JOHNSON, C. A., SCHNEIDER, C. The abdominal constriction response and its suppression by analgesic drugs in the mouse. **British Journal of Pharmacology and Chemotherapy**, v.3 2, p. 295–310, 1968.

COSGROVE, D. J. Growth of the plant cell wall. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 6, n. 11, p. 850-861, 2005.

COSTANTIN, M. B.; SARTORELLI, P.; LIMBERGER, R.; HENRIQUES, A. T.; STEPPE, M.; FERREIRA, M. J. P.; OHARA, M. T.; EMERENCIANO, V. P.; KATO, M. J. Essential oils from *Piper cernuum* and *Piper regnellii*: Antimicrobial activities and analysis by GC/MS and ¹³C-NMR. **Planta Medica**, v. 67, p. 771-773, 2001;

DAS, D.; MAITI, S.; MAITI, T.K.; ISLAM, S.S. A new arabinoxylan from green leaves of *Litsea glutinosa* (Lauraeae): Structural and biological studies. **Carbohydrate Polymers**, v. 92, p. 1243-1248, 2013.

DELGOBO, C. L.; GORIN, P. A. J.; JONES, C.; IACOMINI, M. Gum heteropolysaccharide and free reducing mono- and oligosaccharides of *Anadenanthera colubrina*. **Phytochemistry**, v. 47, p. 1207-1214, 1998.

DEY, P. M.; BROWNLEADER, M. D.; HARBORNE, J. B. The plant, the cell and its molecular components. In: DEY, P. M.; HARBORNE, J. B. **Plant Biochemistry**. Bristol: Academic Press, p. 6-9, 1997.

DI STASI, L. C., SANTOS, E. M. G., SANTOS C. M. & HIRUMA, C. A. 1989. **Plantas medicinais na Amazônia**. Editora Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, São Paulo.

DUBIN, A. E.; PATAPOUTIAN, A. Nociceptors: The sensors of the pain pathway. **Journal of Clinical Investigation**, v. 120, n. 11, p. 3760–3772, 2010.

DUBOIS, M; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Anal. Chem.**, v. 28, p. 350-356, 1956.

DUTRA, R. C.; CAMPOS, M. M.; SANTOS, A. R. S.; CALIXTO, J. B. Medicinal plants in Brazil: Pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. **Pharmacological Research**, v.112, p.4-29, 2016.

FENGEL, D.; WEGENER, G. **Wood: chemistry, ultrastructure, reactions**. Berlin:Walter de Gruyter, p. 613, 1989.

FILISSETTI-COZZI, T. M. C. C.; CARPITA, N. C. Measurement of uronic acids without interference from neutral sugars. **Analytical Biochemistry**, v. 197, p. 157-162, 1991.

FINCHER, G. B.; STONE B. A. Arabinogalactan-proteins: structure, biosynthesis and function. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 34, p. 47-70, 1983.

GARCIA, F. P.; LAZARIN-BIDOIA, D.; UEDA-NAKAMURA, T. SILVA, S. O.; NAKAMURA, C. V. Eupomatenoid-5 isolated from leaves of *Piper regnellii* induces apoptosis in *Leishmania amazonensis*. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, ID 940531, 2013;

GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. Polysaccharides of the lichens *Cetraria islandica* and *Ramalina usnea*. **Carbohydrate Research**, v. 128, n. 1, p. 119-132, 1984.

GRANDI, T. S. M., TRINDADE, J. A., PINTO, M. J. F., 1989. Plantas medicinais de Minas Gerais, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 3, n. 2, p. 185–224.

GREGORY, A. C. E.; O'CONNELL, A. P.; BOLWELL, G. P. Xylans. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, Andover, v. 15, p. 439-455, 1998.

ISOBE, T.; OHSAKI, K.; NAGAKA, K. Antibacterial constituents against *Helicobacter pylori* of Brazilian medicinal plant, Pariparoba. **Yakugaku Zasshi**, v. 122, 291–294, 2002.

IWAMOTO, L. H., VENDRAMINI-COSTA, D. B., MONTEIRO, P. A., RUIZ, A. L., SOUSA, I. M., FOGLIO, M. A., de CARVALHO, J. E., RODRIGUES, R. A. Anticancer and anti-inflammatory activities of a standardized dichloromethane extract from *Piper umbellatum* L. leaves. **Evidence-Based Complementary Alternative Medicine**, v. 2015, p. 1-8, 2015.

JULIUS, D. Molecular mechanisms of nociception. **Nature**, v. 413, p. 203–210, 2001.

JUNGLES, T. M. C., FERREIRA, D. M.; SILVA, L. M.; BAGGIO, C. H.; WERNER, M. F. P.; IACOMINI, M.; CIPRIANI, T. R.; CORDEIRO, L. M. C. Polysaccharides from prunes: Gastroprotective activity and structural elucidation of bioactive pectins. **Food chemistry**, v. 146, p. 492-499, 2014.

JUNIOR, I. F. S.; OLIVEIRA, R. G.; SOARES, I. M.; ALVIM, T. C.; ASCÊNCIO, S. D.; MARTINS, D. T. O. Evaluation of acute toxicity, antibacterial activity, and mode of action of the hydroethanolic extract of *Piper umbellatum* L. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 151, p. 137-143, 2014.

JUNIOR, I. F. S.; BALOGUN, S. O.; OLIVEIRA, R. G.; DAMAZO, A. S.; MARTINS, D. T. O.; *Piper umbellatum* L.: A medicinal plant with gastric-ulcer protective and ulcer healing effects in experimental rodent models. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 192, p. 123-131. 2016.

KASHANIPOUR, R. A., MCGEE, R. J., 2004. Northern Lacandon Maya Medicinal Plant use in Communities of Lacanja Chan Sayab and Naha, Chiapas, Mexico. **Journal of Ecological Anthropology**, v. 8, p. 47–66, 2004.

KIJJOA A.; GIESBRECHT A. M.; AKISUE, M. K.; GOTTLIEB O. R.; GOTTLIEB, H. E. 4-Nerolidylcatechol from *Pothomorphe umbellata*. **Planta Medica**, v. 39 p. 85-87, 1980.

KOMALAVILAS, P.; MORT, A. J. The acetylation at O-3 of galacturonic acid in the rhamnose-rich portion of pectins. **Carbohydrate Research**, v. 189, p. 261-272, 1989.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; ASTER, J. C. Robbins patologia básica. 9. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2013.

KOROISHI, A. M.; FOSS, S. R.; CORTEZ, D. A. G.; UEDA-NAKAMURA, T.; NAKAMURA, C. V.; DIAS FILHO, B. P. *In vitro* antifungal activity of extracts and neolignans from *Piper regnellii* against dermatophytes. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 117, p. 270-277, 2008.

LEIVAS, C.L.; NASCIMENTO, L.F.; BARROS, W.M.; SANTOS, A.R.S.; IACOMINI, M.; CORDEIRO, L.M.C. Substitued galacturonan from starfruit: Chemical structure and antinociceptive and anti-inflammatory effects. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 84, p. 295-300, 2016.

LOPES, A. P.; BAGATELA, B. S.; ROSA, P. C. P.; NANAYAKKARA, D. N. P.; CARVALHO, J. C. T.; MAISTRO, E. L.; BASTOS, J. K.; PERAZZO, F. F. Antioxidant and Cytotoxic Effects of Crude Extract, Fractions and 4-Nerolidylcatechol from Aerial Parts of *Pothomorphe umbellata* L. (*Piperaceae*). **BioMed Research International**, p.1-5, 2013

LONGATO, G. B.; RIZZO, L. Y.; SOUSA, I. M. de O.; TINTI, S. V.; POSSENTI, A.; FIGUEIRA, G. M.; RUIZ, A. L. T. G.; FOGLIO, M. A.; de CARVALHO, J. E. *In vitro* and *in vivo* anticancer activity of extracts, fractions and eupomatenoid-5 obtained from *Piper regnellii* leaves. **Planta Medica**, v. 77, p. 1482-1488, 2011.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas Medicinais do Brasil: Nativas e Exóticas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, p. 414, 2002.

LUIZE, P. S.; UEDA-NAKAMURA, T.; DIAS FILHO, B. P.; CORTEZ, D. A. G.; NAKAMURA, C. V. Activity of neolignans isolated from *Piper regnellii* (Miq.) C. DC. var. *pallenscens* (C. DC.) Yunck against *Trypanosoma cruzi*. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 29, n. 10, p. 2123-2130, 2006.

MOHNEN, D. Pectin structure and biosynthesis. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 11, p. 266-277, 2008.

NASCIMENTO, G.E.; HAMM, L.A.; BAGGIO, C.H.; WERNER, M.F. de P.; IACOMINI, M.; CORDEIRO, L.M.C. Structure of a galactoarabinoglucuroxylan from tamarillo (*Solanum betaceum*), a tropical exotic fruit, and its biological activity. **Food Chemistry**, v. 141, p. 510-516, 2013.

NASCIMENTO, G.E.; CORSO, C.R.; WERNER, M.F. de P.; BAGGIO, C.H.; IACOMINI, M.; CORDEIRO, L.M.C. Structure of and arabinogalactan from the edible tropical fruit tamarillo (*Solanum betaceum*) and its antinociceptive activity. **Carbohydrate Polymers**, v. 116, p.300-306, 2015.

NERGARD, C. S.; DIALLO, D.; INNGJERDINGEN, K.; MICHAELSEN, T. E.; MATSUMOTO, T.; KIYOHARA, H.; YAMADA, H.; PAULSEN, B. S. Medicinal use of *Cochlospermum tinctorium* in Mali: anti-ulcer, radical scavenging - and immunomodulating activities of polymers in the aqueous extract of the roots. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 96, p. 255-269, 2005.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M. The influence of natural products upon drug discovery. **Natural Products Reports**, v. 17, p. 215-234, 2000.

NÚÑEZ, V.; CASTRO, V. MURILLO, R. PONCE-SOTO, L. A.; MERFORT, I.; LOMONTE, B. Inhibitory effects of *Piper umbellatum* and *Piper peltatum* extracts towards myotoxic phospholipases A2 from *Bothrops* snake venoms: -Isolation of 4-nerolidylcatechol as active principle. **Phytochemistry**, v. 66, p. 1017-1025, 2005.

OLIVEIRA, A.F.; NASCIMENTO, G.E.; IACOMINI, M.; CORDEIRO, L.M.C.; CIPRIANI, T.R. Chemical structure and anti-inflammatory effect of polysaccharides obtained from infusion of *Sedum dendroideum* leaves. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 105, p. 940-946, 2017.

OVODOVA, R. G.; GOLOVCHENKO, V. V.; POPOV, S. V.; POPOVA, G. Y.; PADERIN, N. M.; SHASHKOV, A. S.; OVODOV, Y. S. Chemical composition and anti-inflammatory activity of pectic polysaccharide isolated from celery stalks. **Food Chemistry**, v. 114, p. 610-615, 2009.

PERAZZO, F. B.; SOUZA, G. H. B.; LOPES, W.; CARDOSO, L. G. V.; CARVALHO, J. C. T.; NANAYAKKARA, N. P. D.; BASTOS, J. K. Anti-inflammatory and analgesic properties of water-ethanolic extract from *Pothomorphe umbellata* (Piperaceae) aerial parts. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 99, p. 215-220, 2005.

PESSINI, G. L.; ALBIERO, A. L. M.; MOURÃO, K. S. M.; NAKAMURA, C. V.; DIAS FILHO, B. P.; CORTEZ, D. A. G. Análise farmacognóstica de *Piper regnellii* (Miq.) C. DC. var. *pallescens* (C. DC.) Yunck: Aspectos Botânicos e enfoque físico-químico preliminar. **Latin America Journal of Pharmacy**, v. 22, n. 3, p. 209-216, 2003.

PESSINI, G. L.; DIAS FILHO, B. P.; NAKAMURA, C. V.; CORTEZ, D. A. G. Antibacterial activity of extracts and neolignans from *Piper regnellii* (Miq.) C. DC. var. *pallescens* (C. DC.) Yunck. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 8, p. 1115-1120, 2003.

PINHO-RIBEIRO, F. A.; VERRI, W. A.; CHIU, I. M. Nociceptor sensory neuron-immune interactions in pain and inflammation. **Trends in Immunology**, 2017.

POPOV, S. V.; OVODOVA, R. G.; GOLOVCHENKO, V. V.; PUPOVA, G. Y.; VIATYASEV, F. V.; SHASHKOV, A. S.; OVODOV, Y. S. Chemical composition and anti-inflammatory activity of a pectic polysaccharide isolated from sweet pepper using a simulated gastric medium. **Food Chemistry**, v. 124, p. 309-315, 2011.

RASKIN, I.; RIBNICKY, D. M.; KOMARNYTSKY, S.; ILIC, N.; POULEV, A.; BORISJUK, N.; BRINKER, A.; MORENO, D. A.; RIPOLL, C.; YAKOBY, N.; O'NEAL, J. M.; CORNWELL, T.; PASTOR, I.; FRIDLENDER, B. Plants and human health in the twenty-first century. **TRENDS in Biotechnology**, v. 20, no. 12, 2002.

RATES, S. M. K. Plants as source of drugs. **Toxicon**, v. 39, p. 603-613, 2001.

REID, J. S. G. Carbohydrate metabolism: structural carbohydrates. In: DEY, P. M.; HARBORNE, J. B. **Plant Biochemistry**. Bristol: Academic Press, 1997. p. 205-235.

RENARD, C. M. G. C.; LAHAYE, M.; MUTTER, M.; VORAGEN, F. G. J.; THIBAUT, J. F. Isolation and structural characterisation of rhamnogalacturonan oligomers generated by controlled acid hydrolysis of sugar-beet pulp. **Carbohydrate Research**, v. 305, p. 271-280, 1998.

REZENDE, K. R.; BARROS, S. B. M.; Quantification of 4-nerolidylcatechol from *Pothomorphe umbellata* (Piperaceae) in rat plasma samples by HPLC-UV. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 40, n.3, p.373-380, 2004.

RIBEIRO R. A., VALE, M. L., THOMAZZI, S. M., PASCHOALATO, A. B., POOLE, S., FERREIRA, S. H., CUNHA, F. Q. Involvement of resident macrophages and mast cells in the writhing nociceptive response induced by zymosan and acetic acid in mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 387, p. 111–118, 2000.

RIDLEY, B. L.; O'NEILL, M. A.; MOHNEN, D. Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. **Phytochemistry**, v. 57, p. 929-967, 2001.

ROERSCH, C. M. B. F. A comparative cross-cultural analysis of its medicinal uses and an ethnopharmacological evaluation. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 131, p. 522-537, 2010.

ROMÁN, Y.; BARDDAL, H.P.O.; IACOMINI, M.; SASSAKI, G.L.; CIPRIANI, T.R. Anticoagulant and antithrombotic effects of chemically sulfated fucogalactan and citrus pectin. **Carbohydrate Polymers**, v.174, p. 731-739, 2017.

ROPKE, C. D.; MEIRELLES, R. R.; da SILVA, V. V.; SAWADA, T. C. H.; BARROS, S. B. M. *Pothomorphe umbellata* extract prevents α -tocopherol depletion after UV-irradiation. **Photochemistry and Photobiology**, v. 78, n. 5, p. 436-439, 2003.

ROSA, C.; CÂMARA, S. G.; BERIA, J. U. Representações e intenção de uso da fitoterapiana atenção básica à saúde. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 16, p. 311-318, 2011.

SACOMAN, J. L.; MONTEIRO, K. M.; POSSENTI, A. FIGUEIRA, G. M.; FOGLIO, M. A.; CARVALHO, J. E. Cytotoxicity and antitumoral activity of dichloromethane extract and its fractions from *Pothomorphe umbellata*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 41, p. 411-415, 2008.

SASSAKI, G. L.; GORIN, P. A. J.; SOUZA, L. M.; CZELUSNIAK, P. A.; IACOMINI, M. Rapid synthesis of partially O-methylated alditol acetate standards for GC-MS: some relative activities of hydroxyl groups of methyl glycopyranosides on Purdie methylation. **Carbohydrate Research**, v. 340, p. 731-739, 2005.

SASSAKI, G. L.; GUERRINI, M.; SERRATO, R. V.; SANTANA-FILHO, A. P.; CARLOTTO, J.; SIMAS-TOSIN, F.; GORIN, P. A. J. Monosaccharide composition of glycans based on Q-HSQC NMR. **Carbohydrate Polymers**, v. 104, p.34–41, 2014

SCHMELZER, G.H. *Piper umbellatum* L. In: van Valkenburg, J.L.C.H., Bunyapraphatsara, N. *Plant Resources of South-East Asia No. 12(2): Medicinal and Poisonous Plants 2*. Leiden, Netherlands: Backhuys Publishers, 2001.

SCHOLZ, J.; WOOLF, C.J. Can we conquer pain? **Nature Neuroscience**, v. 5, p. 1062-1067, 2002.

SCODRO, R. B. L.; PIRES, C. T. A; CARRARA, V. S.; LEMOS, C. O. T., CARDOZO-FILHO, L.; SOUZA, V. A.; CORRÊA, A. G.; SIQUEIRA, V. L. D.; LONARDONI, M. V. C.; CARDOSO, R. F.; CORTEZ, D. A. G. Anti-tuberculosis neolignans from *Piper regnellii*. **Phytomedicine**, v. 20, p. 600-604, 2013.

SIMAS, F.F.; MAURER-MENESTRINA, J.; REIS, R.A.; SASSAKI, G.L.; IACOMINI, M.; GORIN, P.A.J. Structure of the fucose-containing acidic heteroxylan from the gum exudate of *Syagrus romanzoffiana* (Queen palm). **Carbohydrate Polymers**, v. 63, p.30-39, 2006.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R.. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5a. Edição. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, 2003.

SKIPSKI, V. P. Thin layer chromatography of neutral glycolipids. **Methods in Enzymology**, v. 35, p. 396-425, 1975.

SRIVASTAVA, R.; KULSHRESHTHA, D. K. Bioactive polysaccharides from plants. **Phytochemistry**, v. 28, n. 11, p. 2877-2883, 1989.

STEPHEN, A. M. Other plant polysaccharides. In: ASPINALL, G. O. **The Polysaccharides**. Orlando: Academic Press, p. 97-193, 1983

TABOPDA, K. T.; NGOUPAYO, J.; LIU, J.; MITAINE-OFFER, A.; TANOLI, S. A. K.; KHAN, S. N.; ALI, M. S.; NGADJUI, B. T.; TSAMO, E.; LACAILLE-DUBOIS, M.; LUU, B. Bioactive aristolactams from *Piper umbellatum*. **Phytochemistry**, v. 66, p. 1726-1731, 2008.

TAMAKI, Y.; KONISHI, T.; FUKUTA, M.; TAKO, M. Isolation and structural characterisation of pectin from endocarp of *Citrus depressa*. **Food Chemistry**, v. 107, n. 1, p. 352-361, 2008.

TRACEY, W. D. Nociception. *Current Biology*, v. 27, n. 4, p. R129–R133, 2017.

VARNER, J. E.; LIN, L. S. Plant cell wall architecture. **Cell**, Cambridge, v. 56, p.231-239, 1989.

WANG, J.; FLAISHER-GRINBERG, S.; LIU, H.; SUN, L.; ZHOU, Y.; EINAT, H. Antidepressant-like effects of the active acidic polysaccharide portion of ginseng in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 132, p. 65-69, 2010.

WOLFROM, M. L.; THOMPSON, A. Reduction with sodium borohydride. **Methods in Carbohydrate Chemistry**, v. 2, p. 65-67, 1963.